

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ЭЛЕКТРОАКУСТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ БАКТЕРИОФАГОВ В ЖИДКОЙ ФАЗЕ

© 2016 г. О.И. Гулий* ** ***, Б.Д. Зайцев****, И.Е. Кузнецова*****,
А.М. Шихабудинов****, А.Б. Балко*****, А.А. Теплых****,
С.А. Староверов* ** ***, Л.А. Дыкман* ***,
С.С. Макарихина*****, 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 РАСХН,
410028, Саратов, ул. 53 Стрелковой Дивизии, 6;

****Саратовский филиал Института радиотехники и электроники РАН, 410019, Саратов, ул. Зеленая, 38;

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

*****Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
03143, Киев, ул. Академика Заболотного, 154;

*****Лицей-интернат естественных наук, 410056, Саратов, ул. Советская, 60

E-mail: gulyi_olga@mail.ru

Поступила в редакцию 18.06.15 г.

После доработки 26.07.15 г.

Впервые показана возможность детекции бактериофагов с использованием метода электроакустического анализа на примере взаимодействия бактериофагов ФА1-Sp59b с микробными клетками *Azospirillum lipoferum* Sp59b. В качестве биологического датчика использовали пьезоэлектрический резонатор с поперечным электрическим полем, содержащий жидкостной контейнер емкостью порядка 1 мл. Установлено, что частотные зависимости реальной и мнимой частей электрического импеданса такого резонатора, нагруженного суспензией микробных клеток с вирусами, значительно отличаются от зависимостей резонатора с контрольной суспензией микробных клеток без вирусов. Показано, что детекция бактериофагов ФА1-Sp59b с помощью микробных клеток возможна как в присутствии посторонних вирусных частиц, так и посторонних микробных клеток. Предложенный способ позволяет достоверно определить тип исследуемого вируса уже после 5 мин его взаимодействия с индикаторной культурой. При этом минимальная концентрация вирусов составляет пять вирусных частиц на клетку. В целом представленные результаты демонстрируют возможность регистрации специфического взаимодействия бактериофагов с микробными клетками и служат основой для разработки биологического датчика для количественной детекции вирусов непосредственно в жидкой фазе.

Ключевые слова: бактериофаги, детекция, *Azospirillum lipoferum* Sp59b, электроакустический метод анализа, пьезоэлектрический резонатор с поперечным электрическим полем.

В последние годы активно развиваются исследования в области разработки новых методов детекции вирусов бактерий для получения результата в течение короткого промежутка времени. Для идентификации вирусов используют различные подходы, такие как микробиологические и биохимические тесты, методы генной инженерии и иммунологические методы [1]. Результаты исследовательской работы при определении и изучении вирусов зависят от того, насколько надежны методы измерения. Эта про-

блема возникает при фаготерапии, скрининге химических соединений – потенциальных лекарственных препаратов, при технологии производства вирусных и вирионных частиц как лечебных средств и средств целевой доставки лекарственных препаратов [2].

Поэтому актуальной задачей является разработка новых экспресс-методов детекции бактериофагов, позволяющих получать точные результаты за короткое время. Одним из перспективных методов развития данного направ-

ления является применение электроакустического анализа.

Электроакустический анализ основан на регистрации изменения информационного сигнала в результате специфического биологического взаимодействия. Такая методика находит применение не только в технических экспериментах, но также используется в медицине и для анализа биологических жидкостей [3]. Акустические методы анализа привлекают все большее внимание исследователей для анализа биологических взаимодействий, поскольку характеризуются высокой чувствительностью и быстротой анализа. Некоторые методы основаны на использовании в качестве рецептора белка активных слоев или мембран, нанесенных на поверхность пьезоэлектрического звукопровода или резонатора [4].

Существуют также акустические методы анализа биологических взаимодействий непосредственно в жидкой суспензии, контактирующей с поверхностью пьезоэлектрика. Этот подход характеризуется значительно меньшим временем детекции по сравнению с методами, использующими активные пленки. Например, для резонатора с продольным электрическим полем показана возможность детекции эндотоксина [5] и фибриногена [6] при добавлении соответствующих реагентов, изменяющих вязкость суспензий и приводящих к сдвигу резонансной частоты. В последние годы большой интерес исследователей 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. В настоящее время существует большое количество статей и патентов, посвященных этим резонаторам и их использованию для решения биотехнологических задач [7–11]. Ранее была показана возможность детекции микробных клеток *E. coli* при их инфекции бактериофагом с помощью электроакустического датчика [12]. Была также показана возможность детекции микробных клеток в суспензии при помощи резонатора с поперечным электрическим полем на примере клеток *A. brasilense* Sp245 при их взаимодействии со специфическими миниантителами [13].

Целью данной работы было изучение возможности детекции бактериофагов в жидкой фазе путем регистрации их взаимодействия со специфическими микробными клетками при помощи резонатора с поперечным электрическим полем на примере бактериофага ФА1-Sp59b и клеток *A. lipoferum* штамма Sp59b.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные штаммы и условия выращивания бактерий. В работе были использованы микроорганизмы рода *Azospirillum*: *A. lipoferum* штаммов Sp59b (IBPPM 173), SR65 (IBPPM 44), *A. brasilense* Sp7 (IBPPM 150), штаммов Cd, Jm6B2 и *A. irakense* KBC1, полученные из коллекций ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН.

Микроорганизмы хранили при 4°C и пересеивали каждые две недели.

Для культивирования бактерий использовали жидкую питательную среду LB [14] следующего состава (г/л): NaCl (ЗАО «ЛенРеактив», Россия) – 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.

Для хранения микроорганизмов азоспирилл использовали среду следующего состава (г/л): клубни картофеля – 200, агар-агар – 30.

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

Выделение и характеристика бактериофагов. Выделение бактериофагов проводили посредством воздействия низкой температуры [14]. Выращенную культуру микроорганизмов охлаждали в холодильнике при 4°C в течение 1,5–2,0 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%-го раствора полиэтиленгликоля (PEG6000, Panreac, Испания) с добавлением 1,6 M 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 mM трис-HCl, 1 mM 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 количества фаговых частиц.

Концентрацию фаговых частиц определяли спектрофотометрически на приборе Specord BS-250 (Analytik Jena, Германия) в кювете с длиной оптического пути 1 мм. Исходя из того, что 30 опт. ед. соответствует значению $2 \cdot 10^{14}$ фаговых частиц/мл [15], справедливо было использовать для расчетов следующую формулу: $(A_{269} - A_{320}) \times 5 \cdot 10^{14}/15$, где A_{269} и A_{320} – оптическая плотность суспензии при длинах волн 269 и 320 нм соответственно.

Проведение анализа с помощью электроакустического датчика. Все эксперименты по изучению изменений механических и электрических свойств суспензий бактериофагов при биоспецифическом взаимодействии фагов с микробными клетками 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 $5 \cdot 10$ мм² с зазором между ними 3 мм. Область вокруг электродов и часть электродов были покрыты специальным лаком, который демпфировал паразитные волны Лэмба [16] и обеспечивал достаточно высокую добротность ~630. На верхней стороне пластины была приклеена жидкостная ячейка объемом ~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, США).

Все эксперименты проводились не менее чем в пяти повторностях. Относительная погрешность результатов измерений исследуемых образцов составляла $\pm 2\%$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для работы с вирусами и вирионными частицами разработано большое количество методов и подходов. Существующие методы идентификации вирусных частиц могут быть разделены на следующие группы: 1) методы детекции (идентификации, определения концентрации, размеров и иных физико-химических свойств) вирусных частиц (вирионов); 2) методы определения вирусных антигенов; 3) методы определения вирусных нуклеиновых кислот [17].

В данной работе для изучения взаимодействия бактериофагов с микробными клетками был использован вышеупомянутый пьезоэлектрический резонатор с поперечным возбуждающим электрическим полем [12,13], разработанный в лаборатории физической акустики Саратовского филиала Института радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН.

Согласно предварительным экспериментам по оптимизации условий проведения анализа был выбран диапазон частот 6–7 МГц, при этом время эксперимента составляло 10 мин. В измерительную ячейку вносили суспензию с концентрацией 10^8 клеток/мл. В качестве модельного образца использовали микробные клетки *A. lipoferum* Sp59b и специфический бактериофаг ΦA1-Sp59b. Основные свойства бактериофага были описаны ранее в работе [18].

С помощью пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем проводили изучение взаимодействия клеток *A. lipoferum* Sp59b с разным количеством бактериофага ΦA1-Sp59b. Для этого в суспензию бактерий *A. lipoferum* Sp59b вносили соответствующий вирус из расчета 5, 10, 15 и 20 вирусных частиц на клетку. В качестве контроля использовали суспензию бактериальных клеток без добавления вируса. Время инкубации клеток с бактериофагов составляло ~10 мин.

Согласно полученным статистическим данным, осязательное изменение частотных зависимостей реальной части электрического импеданса происходит уже при концентрации бактериофага в образце порядка пяти вирусных частиц на клетку (рис. 1). При дальнейшем росте концентрации бактериофагов в суспензии значение реальной части импеданса монотонно возрастает вплоть до концентрации 20 бактериофагов на клетку, а затем уменьшается. При этом мнимая часть импеданса с ростом концентрации бактериофагов монотонно увеличивается начиная с концентрации 10 бактериофагов на клетку. Таким образом, электроакустический метод анализа позволяет определить бактериофаг ΦA1-Sp59b, при этом титр бактериофага составляет 10^6 фаговых частиц/мл. Очевидно, что в качестве информационного параметра следует взять значения реальной и мнимой частей электрического импеданса на фиксированной частоте.

Далее исследовали оптимальное время взаимодействия суспензии клеток с бактериофагом ΦA1-Sp59b для оптимизации времени анализа. Для этого в предварительно подготовленную суспензию клеток индикаторной культуры *A. lipoferum* штамма Sp59b в количестве 1 мл вносили бактериофаг из расчета 10 вирусных час-

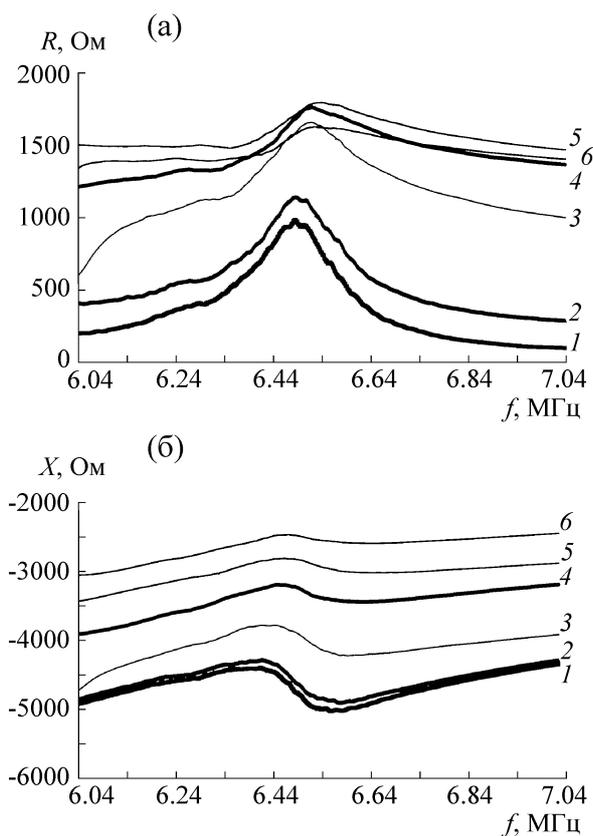


Рис. 1. Частотные зависимости реальной (а) и мнимой (б) частей электрического импеданса (количество клеток в ячейке 10^8 кл/мл) при взаимодействии клеток *A. lipoferum* Sp59b с бактериофагом ФА1-Sp59b: 1 – суспензия клеток без добавления вируса; 2, 3, 4, 5 и 6 – суспензии клеток с бактериофагами в концентрации 5, 10, 15, 20 и 25 вирусных частиц на клетку соответственно.

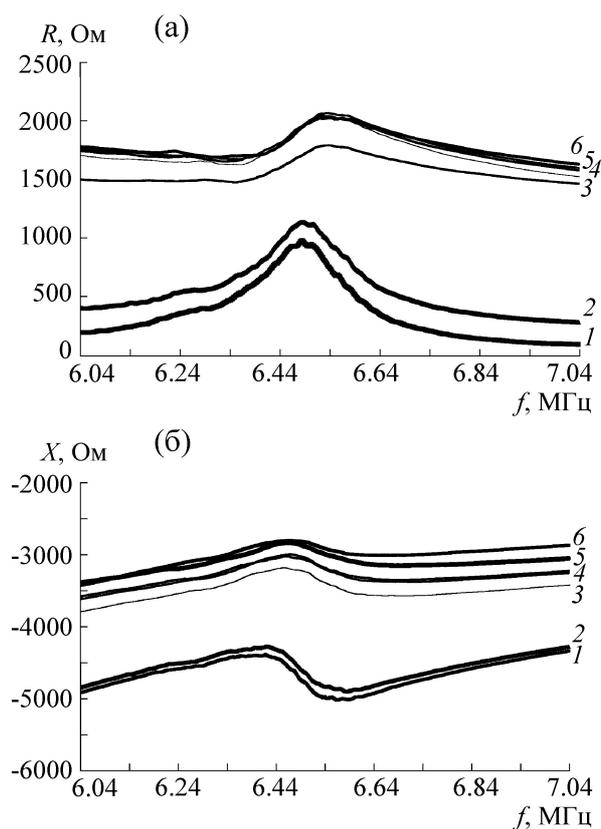


Рис. 2. Частотные зависимости реальной (а) и мнимой (б) частей электрического импеданса (количество клеток в ячейке 10^8 кл/мл) при взаимодействии клеток *A. lipoferum* Sp59b с бактериофагом ФА1-Sp59b: 1 – суспензия клеток без добавления вируса; 2, 3, 4, 5 и 6 – суспензии клеток с бактериофагом после инкубации в течение 1, 5, 10, 20 и 30 мин соответственно.

тиц на клетку и инкубировали при 25°C в течение различного периода времени – от 1 до 30 мин. Для контроля были измерены частотные зависимости реальной и мнимой частей электрического импеданса для суспензии клеток *A. lipoferum* Sp59b без добавления вирусов.

Как видно из полученных данных, значительное изменение указанных частотных характеристик наблюдается уже после 5 мин взаимодействия бактериофага ФА1-Sp59b с индикаторной культурой. Значения импеданса после 10, 20 и 30 мин инкубации практически не отличаются (рис. 2).

На следующем этапе работы исследовали возможность детекции бактериофагов в присутствии таких мешающих факторов, как вирусы других типов. В качестве мешающих факторов были выбраны бактериофаги ФАб-Sp7 и ФАб-SR75, выделенные из клеток *A. brasiliense* Sp7 и *A. brasiliense* SR75 соответственно, описанные в работе [19].

Для проведения исследований в суспензию бактерий *A. lipoferum* штамма Sp59b, подготовленных для электроакустического анализа, вносили смесь бактериофагов ФА1-Sp59b, ФАб-Sp7 и ФАб-SR75 (в соотношении 1:1:1) из расчета 10 фаговых частиц на клетку. В качестве контроля использовали клетки *A. lipoferum* штамма Sp59b с добавлением вирусов ФАб-Sp7 и ФАб-SR75. Полученные результаты показывают, что в присутствии бактериофага ФА1-Sp59b в суспензии частотные зависимости реальной и мнимой частей импеданса датчика существенно меняются, что говорит о специфическом взаимодействии изучаемого вируса с индикаторной культурой *A. lipoferum* Sp59b (рис. 3). Характерно, что добавление вирусных частиц ФАб-Sp7 и ФАб-SR75 к бактериям *A. lipoferum* Sp59b не приводит к изменению анализируемых зависимостей. Данные, полученные методом электроакустического анализа, были подтверждены микробиологическими экспериментами. Таким

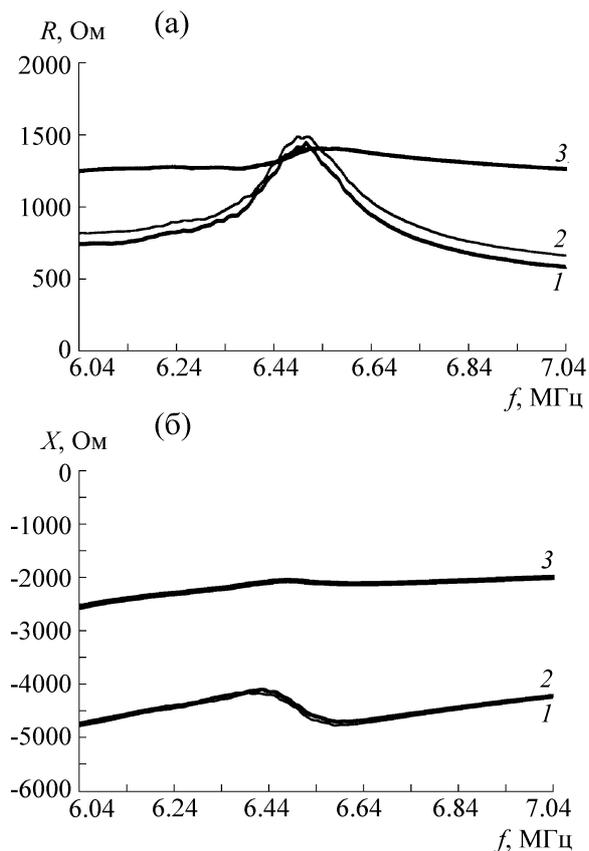


Рис. 3. Частотные зависимости реальной (а) и мнимой (б) частей электрического импеданса (количество клеток в ячейке 10^8 кл/мл) при анализе взаимодействия клеток *A. lipoferum* Sp59b со смесью бактериофагов: 1 – суспензия клеток без добавления вирусов; 2 – суспензия клеток с добавлением бактериофагов ФАб-Sp7 и ФАб-SR75; 3 – суспензия клеток с добавлением смеси бактериофагов ФА1-Sp59b, ФАб-Sp7 и ФАб-SR75.

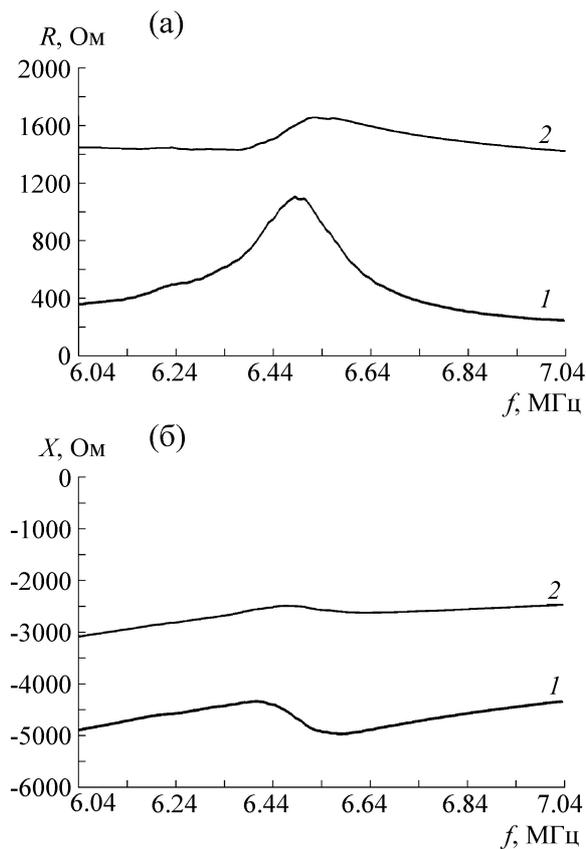


Рис. 4. Частотные зависимости реальной (а) и мнимой (б) частей электрического импеданса (количество клеток в ячейке 10^8 кл/мл) при анализе взаимодействия бактериофага ФА1-Sp59b со смешанной суспензией клеток *A. lipoferum* Sp59b, *A. brasilense* Cd, Jm6B2 и *A. irakense* KBC1: 1 – контроль – суспензия клеток без добавления вирусов; 2 – суспензия клеток с добавлением бактериофага ФА1-Sp59b).

образом, можно утверждать, что электроакустический датчик с поперечным возбуждающим полем может быть использован для детекции бактериофага ФА1-Sp59b с использованием клеток *A. lipoferum* Sp59b даже в присутствии посторонних вирусов.

В дальнейшем была изучена возможность детекции бактериофагов с использованием электроакустического датчика в присутствии таких мешающих факторов, как посторонние микробные клетки. В качестве посторонней микрофлоры были использованы бактерии *A. brasilense* штаммов Cd, Jm6B2, а также *A. irakense* штамма KBC1. Выбор данных культур обусловлен тем, что бактериофаг ФА1-Sp59b не проявляет активность в отношении них, как было показано ранее [18]. Клетки *A. lipoferum* штамма Sp59b, *A. brasilense* штаммов Cd, Jm6B2 и *A. irakense* KBC1 смешивали в равной пропорции (1:1:1), добавляли к ним бактериофаг ФА1-Sp59b из

расчета 10 фаговых частиц на клетку и измеряли частотные зависимости электрического импеданса. Смешанную суспензию бактерий *A. lipoferum* штамма Sp59b, *A. brasilense* штаммов Cd, Jm6B2 и *A. irakense* KBC1 без добавления изучаемого бактериофага использовали в качестве контроля. Следует отметить, что в обоих случаях концентрация клеток в исследуемой суспензии составляла 10^8 кл/мл. Как показывает график (рис. 4), при добавлении к смешанной суспензии клеток бактериофага ФА1-Sp59b происходят статистически достоверные изменения импеданса. При этом импеданс не меняется при добавлении вируса ФА1-Sp59b к смеси клеток *A. brasilense* штаммов Cd, Jm6B2 и *A. irakense* KBC1 (без специфических клеток *A. lipoferum* штамма Sp59b), т.е. в этом случае биологическое взаимодействие с изучаемым бактериофагом не происходит и частотные зависимости не меняются (рис. 5).

Таким образом, показана возможность детекции бактериофага ФА1-Sp59b методом электроакустического анализа с использованием клеток *A. lipoferum* Sp59b. Такой способ позволяет достоверно определить исследуемый вирус при минимальной его концентрации порядка пяти вирусных частиц на клетку после 5 мин взаимодействия вируса с индикаторной культурой. Кроме того, электроакустический датчик с поперечным возбуждающим полем позволяет проводить индикацию вируса ФА1-Sp59b с помощью клеток *A. lipoferum* Sp59b в присутствии мешающих факторов, таких как посторонние бактериофаги и микробные клетки.

Теперь остановимся на объяснении полученных результатов с физической точки зрения. В простейшем случае эквивалентная схема резонатора с поперечным электрическим полем вблизи резонанса имеет следующий вид (см. рис. 6). Здесь R_1 – активное сопротивление, определяющее возбуждение акустической волны в резонаторе, C – емкость резонатора, а R_2 – сопротивление утечки емкости резонатора, связанное с проводимостью суспензии. При этом нетрудно увидеть, что в точках a и b схемы реальная и мнимая части электрического импеданса соответственно равны

$$\operatorname{Re} Z_{ab} = R_1 + R_2 / (\omega^2 C^2 R_2^2 + 1), \quad (1)$$

$$\operatorname{Im} Z_{ab} = -\omega C R_2^2 / (\omega^2 C^2 R_2^2 + 1). \quad (2)$$

Известно [20], что при добавлении бактериофага в суспензию специфичных клеток электрическая проводимость суспензии возрастает. Это связано с тем, что взаимодействие фагов с микробными клетками начинается с адсорбции фага на поверхности бактериальной клетки. Зафиксированные изменения частотных характеристик микробных клеток *A. lipoferum* штамма Sp59b наблюдаются уже после 5 мин взаимодействия бактериофага ФА1-Sp59b с индикаторной культурой, что, вероятно, связано с процессом адсорбции бактериофага на микробной клетке. Дальнейшие изменения в клетке-хозяине связаны с различными повреждениями внутриклеточных структур, обусловленные выходом вирусной ДНК в цитоплазму клеток-хозяина и процессами, происходящими в цитоплазме. [21]. 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 [22]. Следовательно, зарегистрированное увеличение электрической проводимости суспензии клеток при их взаимодей-

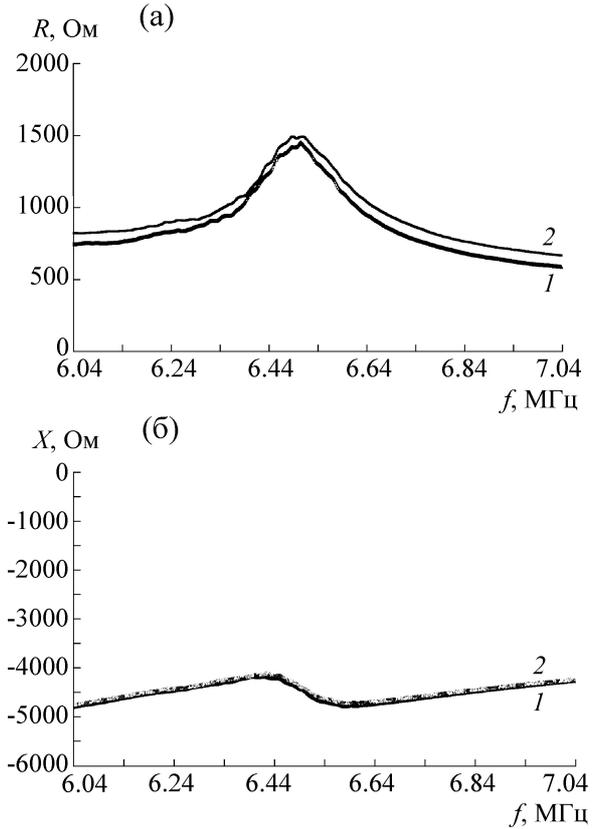


Рис. 5. Частотные зависимости реальной (а) и мнимой (б) частей электрического импеданса (количество клеток в ячейке 10^8 кл/мл) при анализе взаимодействия бактериофага ФА1-Sp59b со смешанной суспензией клеток *A. brasilense* штаммов Cd, Jm6B2 и *A. irakense* KBC1: 1 – контроль – суспензия клеток без добавления вирусов; 2 – суспензия клеток с добавлением бактериофага ФА1-Sp59b).

ствии 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

Таким образом, увеличение проводимости суспензии приводит к уменьшению сопротивления утечки R_2 . Из формул (1) и (2) следует,

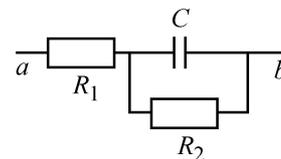


Рис. 6. Эквивалентная схема резонатора с поперечным электрическим полем вблизи резонанса, где R_1 – активное сопротивление, определяющее возбуждение акустической волны в резонаторе, C – емкость резонатора, а R_2 – сопротивление утечки емкости резонатора, связанное с проводимостью суспензии.

что при неизменных значениях ω , C и R_1 величины $\text{Re}Z_{ab}$ и $\text{Im}Z_{ab}$ при уменьшении R_2 будут увеличиваться, что и наблюдается во всех наших экспериментах, в которых происходит специфическое взаимодействие. А тот факт, что при большой концентрации бактериофагов (25 вирусов на клетку) реальная часть импеданса начинает уменьшаться (см. рис. 1), может быть связан с изменением распределения электрического поля в зазоре резонатора, что приводит к изменению величин R_1 и C и нарушению монотонности увеличения $\text{Re}Z_{ab}$ при уменьшении R_2 . Это связано с тем, что, начиная с определенного значения проводимости, проводящая суспензия начинает играть роль третьего виртуального электрода.

Использование метода электроакустического анализа для детекции бактериофагов открывает перспективы для создания экспресс-метода индикации бактериофагов в объектах окружающей среды. Электроакустический метод детекции бактериофагов характеризуется высокой чувствительностью, точностью измерений (в пределах 2%) и минимальным временем для проведения анализа. Основные работы по использованию метода электроакустического анализа лежат в плане создания и использования пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем для детекции бактериальных клеток *E. coli* с использованием активной пленки для закрепления специфических антител на свободной стороне резонатора [23,24]. В этом случае время детекции составляло около 250 мин. Этот же коллектив авторов разработал датчик для определения содержания сакситоксина в водной среде на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным полем и активной пленкой на его поверхности [25] при времени анализа ~2–3 мин. Однако в известной литературе отсутствуют данные об использовании электроакустического метода анализа для детекции вирусных частиц. Поэтому разработка электроакустических методов анализа для решения проблемы детекции бактериофагов является перспективным направлением исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ № МК-5551.2014.9.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. E. Yousef, in *Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and Microsystems*, Ed. by M. Zourob, S. Elwary, and A. Turner (Springer, New York, 2008), pp. 31–48.
2. *Бактериофаги. Биология и практическое применение*, Под. ред. Э. Катер и А. Сулаквелидзе (Научный мир, М., 2012).
3. И. Ю. Демин и Н. В. Прончатов-Рубцов, *Современные акустические методы исследований в биологии и медицине*. Учебно-методический материал по программе повышения квалификации «Хранение и обработка информации в биологических системах» (Нижний Новгород, 2007).
4. D. S. Ballantine, R. M. White, S. J. Martin, et al., *Acoustic Wave Sensors: Theory, Design, and Physico-chemical Applications* (Academic Press, San Diego, 1997).
5. H. Muramatsu, E. Tamiya, M. Suzuki, and I. Karube, *Anal. Chim. Acta.* **217**, 321 (1989).
6. H. Muramatsu, E. Tamiya, M. Suzuki, and I. Karube, *Anal. Chim. Acta.* **215**, 91 (1988).
7. A. Ballato, E. R. Hatch, M. Mizan, and T. J. Lukaszek, *IEEE Trans. on Ultrason., Ferroelectrics, and Freq. Contr.* **UFFC-33** (4), 385 (1986).
8. R. C. Smythe and H. F. Tiersten, *IEEE Trans. Ultrason., Ferroelectrics, Freq. Contr.* **35** (3), 435 (1988).
9. A. Khan and A. Ballato, *IEEE/EIA International Frequency Control Symposium and Exhibition 180* (2000).
10. W. Pinkham, L. French, D. Frankel, and J. Vetelino, in *Proc. IEEE Ultrasonics Symp.* (Rotterdam, 2005), p. 2279.
11. M. Wark, B. Kalanyan, L. Ellis, et al., in *Proc. of IEEE Ultrasonics Symp.* (2007), p. 1217.
12. B. D. Zaitsev, I. E. Kuznetsova, A. M. Shikhabudinov, et al., *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control.* **59** (5), 963 (2012).
13. О. И. Гулий, Б. Д. Зайцев, И. Е. Кузнецова и др., *Биофизика* **57** (3), 460 (2012).
14. J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Ed. by J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., 1982).
15. G. P. Smith and J. K. Scott, *Methods Enzymol.* **217**, 228 (1993).
16. Б. Д. Зайцев, И. Е. Кузнецова, А. М. Шихабудинов и А. А. Васильев, *Письма в журн. техн. физики* **37** (11), 27 (2011).
17. *Virology: principles and applications*, Ed. by J. Carter, V. Saunders (J. Wiley & Sons Ltd, London, 2007).
18. С. С. Макарихина, О. И. Гулий, О. И. Соколов и др., *Изв. Саратовского ун-та, Новая серия. Сер. Химия. Биология. Экология* **13** (2), 56 (2013).
19. О. А. Караваева, О. И. Гулий, С. А. Павлий и др., *Вестн. Уральской мед. акад. науки. Темат. вып. по биологии*. Екатеринбург **4/1** (38), 32 (2011).
20. О. И. Гулий, Б. Д. Зайцев, И. Е. Кузнецова и др., *Биофизика* **60** (4), 722 (2015).
21. E. M. Click and R. E. Webster, *J. Bacteriol.* **179** (20), 6464 (1997).
22. H. Endemann and P. Model, *J. Mol. Biol.* **250** (4), 496 (1995).
23. C. York, L. A. French, P. Millard, and J. F. Vetelino, *Proc. IEEE Ultrason. Symp.* **44** (2005).
24. J. F. Vetelino, in *Proc. IEEE Ultrason. Symp.* (2010), p. 2269..
25. M. Wark, B. Kalanyan, and L. Ellis, in *Proc. IEEE Ultrason. Symp.* (2007), p. 1217.

Use of the Method of Electro-acoustical Analysis for Detection of Bacteriophages in Liquid Phase

O.I. Guliy* ** *, B.D. Zaitsev****, I.E. Kuznetsova*****, A.M. Shikhabudinov*****,
A.B. Balko*****, A.A. Teplykh****, S.A. Staroverov* ** ***, L.A. Dykman* ***,
S.S. Makarikhina*****, 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 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*

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

******Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine,
ul. Akademika Zabolotnogo 154, Kyiv, 03143 Ukraine*

******Liceum of Natural Sciences, ul. Sovetskaya 60, Saratov, 410056 Russia*

For the first time the possibility of detection of bacteriophages was demonstrated using the electro-acoustic method of analysis when considering interaction of bacteriophages FAI-Sp59b with microbial cells *Azospirillum lipoferum* Sp59b. As a biological sensor, a piezoelectric lateral electric field excited resonator containing a liquid container with the volume of ~ 1 ml was used. It has been found that the frequency dependencies of the real and imaginary parts of the electrical impedance of the resonator loaded by suspension of viruses with microbial cells differ significantly from the dependencies of the resonator with the control cell suspension without viruses. It has been shown that the detection of bacteriophages FAI-Sp59b by means of microbial cells is possible also in the presence of other viral particles and extraneous microbial cells. The proposed method allows for reliable determination of the type of the test virus even after 5-min interaction of the virus with the culture cells. In this case the minimum concentration of virus is 5 viral particles per cell. On the whole the obtained results demonstrate the possibility of detecting the specific interaction of bacteriophages with microbial cells and provide a basis for the development of a biological sensor for quantitative detection of viruses directly in liquid phase.

Key words: bacteriophages, detection, Azospirillum lipoferum Sp59b, electro-acoustic method of analysis, piezoelectric electric field excited resonator