

АКУСТИЧЕСКИЙ МЕТОД АНАЛИЗА БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

© 2016 г. О.И. Гулий* ** ***, Б.Д. Зайцев****, И.А. Бородина****,
А.А. Теплых****, О.В. Игнатов*

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

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

***Саратовский научно-исследовательский ветеринарный институт,
410028, Саратов, ул. 53-й Стрелковой дивизии, 6;

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

E-mail: guliy_olga@mail.ru

Поступила в редакцию 03.09.15 г.

После доработки 29.01.16 г.

Продемонстрированы возможности электроакустического биологического датчика на основе резонатора с поперечным электрическим полем для исследования суспензий бактериальных клеток при их взаимодействии со специфическими бактериофагами, миниантителами и поликлональными антителами. Определена чувствительность детекции микробных клеток, которая составила $\sim 10^3$ – 10^4 кл/мл при времени анализа не более 10 мин. Показана возможность детекции бактериальных клеток при их взаимодействии со специфическими реагентами в присутствии посторонней микрофлоры. Описанный метод позволяет определять спектр литической активности бактериофагов и чувствительность микробных клеток к бактериофагам. Представленные результаты демонстрируют перспективность использования датчика на основе резонатора с поперечным электрическим полем для решения вопросов детекции и идентификации микробных клеток и определения их фагоустойчивости в микробиологии, медицине, ветеринарии. Кроме того, результаты экспериментов позволили построить ясную физическую картину процессов, происходящих в суспензии бактериальных клеток в присутствии различных биологических реагентов. Описанный метод может дать полезную информацию и относительно биофизических аспектов взаимодействия в популяции микроорганизмов.

Ключевые слова: акустические методы анализа, детекция, микробные клетки, бактериофаги, антитела, пьезоэлектрический резонатор с поперечным электрическим полем.

Обнаружение и анализ бактериальных клеток имеют большое значение в биотехнологии, микробиологии, медицине и ветеринарии при создании препаратов на основе использования клеток, оптимизации микробиологического синтеза продуктов, а также при разработке новых методов детекции, контроля и диагностики клеток. Для определения микроорганизмов используют различные подходы – микробиологические и биохимические тесты, методы генной инженерии и иммунологические методы. Классические методы определения бактерий, основанные на культивировании микроорганизмов с последующим микробиологическим и биохимическим анализом, отличаются трудоемкостью и длительностью процедуры, а также

использованием дорогостоящего оборудования. Кроме того, большинство методов анализа микробных клеток и определения их физиологического статуса, которые используются в микробиологии, основано на косвенных измерениях параметров внешней среды [1,2]. В этом плане эффективными для определения микроорганизмов являются также методы спектроскопии, флуоресценции, биолюминисценции и др. [3–5], однако они также требуют использования дорогостоящей аппаратуры и привлечение высококвалифицированных специалистов.

В связи с этим методы электрофизического анализа, основанные на исследовании клеток как электрофизических объектов со сложной структурой, и измерении характеристик клеточных структур, представляют собой новый подход к оценке прижизненных физиологических

Сокращения: АГ – антигены, АТ – антитела.

параметров клеток и их гетерогенности [1,2]. Основными направлениями развития новых методов идентификации бактерий с помощью электрофизических методов анализа являются: создание новой техники для изучения электрофизических свойств микробных клеток, изучение влияния тех или иных физико-химических и физиологических процессов на электрофизические свойства клеток, разработка теоретических моделей поведения клеток при воздействии специфических агентов. Новые сенсорные технологии для обнаружения микроорганизмов должны иметь высокую чувствительность, надежность, миниатюрность и иметь возможность получать результат в течение короткого интервала времени. Поэтому среди электрофизических методов анализа стоит особо выделить акустические методы, применение которых для анализа бактерий до недавнего времени носило в основном описательный характер. Возможность применения электроакустического метода для детекции микробных клеток и анализа взаимодействия бактерий со специфическими антителами, бактериофагами и миниантителами является актуальной и будет рассмотрена в данной работе. На основании собственных экспериментальных данных будут показаны области применения метода, в которых он является конкурентоспособным по сравнению с другими методами аналогичного назначения. Также на основе результатов экспериментальных работ будет более четко построена физическая картина процессов, происходящих в суспензии бактериальных клеток в присутствии различных биологических реагентов.

ЭЛЕКТРОАКУСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ И СУСПЕНЗИЙ

Методы электроакустического анализа биологических жидкостей и суспензий активно развиваются в последние два десятилетия. Свидетельством этого является усовершенствование известных и появление новых подходов. Существует множество вариантов акустических биологических датчиков [6–12], которые основаны на использовании объемных, поверхностных или пластинчатых акустических волн.

Акустические датчики, будучи очень чувствительными, имеют преимущество перед датчиками других типов, поскольку могут обнаруживать изменения как механических параметров (плотность, упругость, вязкость), так и электрических свойств (диэлектрическая проницаемость, проводимость) среды, в отличие от других микросенсорных устройств, которые следят

за изменением только одного физического параметра. Акустические датчики измеряют изменения в характеристиках акустических волн (таких как скорость и затухание) при их распространении в пьезоэлектрическом кристалле, контактирующем с исследуемой средой. Наиболее часто используемыми пьезоэлектрическими кристаллами являются кварц (α -SiO₂), ниобат лития (LiNbO₃), танталат лития (LiTaO₃), лангасит (La₃Ga₅SiO₁₄), лангитат (La₃Ga_{5,5}Ta_{0,5}O₁₄) и др.

К настоящему времени существует большое количество вариантов акустических датчиков, среди которых можно выделить датчики, основанные на пьезоэлектрических резонаторах и на линиях задержки на поверхностных (пластинчатых) акустических волнах. Далее будут рассмотрены только наиболее часто применяемые датчики на основе пьезоэлектрических резонаторов.

Следует отметить, что традиционные широко используемые датчики, основанные на резонаторах с продольным электрическим полем, обладают существенным недостатком, поскольку при контакте с жидкостью параметры резонатора реагируют только на изменение механических свойств жидкости и практически не реагируют на изменение ее электрических свойств [13,14]. Тем не менее на протяжении нескольких десятков лет для создания биологических датчиков активно использовались и продолжают возбуждаться резонаторы с продольным возбуждающим электрическим полем [13,14]. Однако в последние годы наибольшее внимание исследователей стали привлекать пьезоэлектрические резонаторы с поперечным электрическим полем, которые имеют хороший потенциал для исследования свойств различных жидкостей, включая биологические суспензии [15–19].

В отличие от обычных резонаторов с продольным электрическим полем эти датчики имеют электроды только на одной стороне подложки, а акустическая волна в основном распространяется в пространстве между электродами. При этом чувствительная поверхность, граничащая с жидкостью или биохимическим слоем исследуемого образца, остается свободной, и исследуемая жидкость не контактирует с электродами. Свободная от металлизации поверхность позволяет датчику реагировать не только на механические свойства исследуемого образца (вязкость), но и на электрические свойства (проводимость, диэлектрическая проницаемость).

На основе резонаторов с поперечным электрическим полем существуют два типа акусти-

ческих биодатчиков для детекции и идентификации бактериальных клеток.

Датчики первого типа используют пленки-биорецепторы, которые закрепляются на поверхности пьезоэлектрического материала на пути следования акустической волны. Биологический материал, например суспензия, содержащая измеряемый объект, контактирует с биодатчиком через указанную пленку. Биологическое взаимодействие между измеряемым объектом и биорецептором приводит к соответствующему изменению характерного аналитического сигнала (фаза и амплитуда выходного сигнала, резонансная частота, электрический импеданс/адмиттанс и т.д.).

Кратко перечислим известные возможности датчиков на основе резонаторов с поперечным электрическим полем с использованием активных пленок. В работе [16] изучен датчик на основе резонатора с поперечным электрическим полем в качестве биосенсора для исследования органофосфатов, содержащихся в овощах и фруктах. Свободная поверхность резонатора покрывалась полиэпихлоргидриновой пленкой, которая избирательно чувствительна к фосмету – пестициду, часто встречающемуся в овощах и фруктах. Было показано, что сдвиг резонансной частоты при увеличении концентрации фосмета превышает сдвиг частоты в обычном кварцевом резонаторе с продольным полем почти на 30%. При этом время анализа составляло ~ 40 мин.

В работе [15] была показана возможность создания датчика на основе резонатора с поперечным электрическим полем для определения содержания сакситоксина в воде. Свободная сторона резонатора покрывалась специальной многослойной чувствительной пленкой. Сдвиг резонансной частоты менялся в пределах 0–20 ppm при изменении концентрации от 0 до 200 мкМ. Время анализа составляло ~ 2–3 мин.

В работе [17] описан датчик на основе резонатора с поперечным электрическим полем, использующий в качестве исследуемых объектов anti-IgG кролика и *E. coli*. На поверхность кварца наносилась пленка NH₂ с помощью специальной вакуумной техники, и затем в течение 8 ч формировался слой, чувствительный к вышеуказанным антигенам. Эксперименты показали, что взаимодействие чувствительного покрытия с раствором антигена приводило к изменению резонансной частоты порядка 20–30 ppm в течение 5–8 ч.

В работе [18] показана возможность разработки биологического датчика на основе резонатора с поперечным электрическим полем с

чувствительной многослойной пленкой на его поверхности. Было установлено, что взаимодействие чувствительного покрытия с суспензией клеток *E. coli* приводило к изменению резонансной частоты в пределах 20 ppm в течение 6 ч.

Следует отметить, что датчики, которые используют активные покрытия, имеют ряд существенных недостатков. К ним относятся длительное время детекции в течение нескольких часов и невозможность многократного использования активного слоя. Сразу же после первого эксперимента отработавшую активную пленку необходимо удалять и наносить новую. Это существенно ограничивает возможности использования датчиков первого типа.

Датчики второго типа, которые свободны от вышеперечисленных недостатков, фиксируют изменение физических свойств биологической жидкости или суспензии, без использования активных пленок. Эти изменения приводят к соответствующему изменению характерного аналитического сигнала (фаза и амплитуда выходного сигнала, резонансная частота, электрический импеданс/адмиттанс и т.д.). Например, в работе [19] описан биологический датчик на основе резонатора с поперечным полем, который позволяет обнаруживать и идентифицировать бактериальные клетки не только при наличии активного реагента на его поверхности, но и непосредственно в жидкой фазе. Эта возможность была продемонстрирована при детекции клеток *S. typhimurium* с применением бактериофагов.

Основная трудность при конструировании резонаторов с поперечным возбуждающим электрическим полем – это подавление нежелательных колебаний с целью обеспечения достаточно высокой добротности для выделенной резонансной частоты. В этом плане существует несколько путей, к которым относятся выбор оптимальной формы электродов и точная их ориентация относительно кристаллографических осей пластины и краев кристалла [15–19], формирование мезоструктур химическим травлением части поверхности пьезокристалла и использование выпуклой формы поверхности или нанесение поглощающего покрытия на определенную область резонатора [20].

На основе резонатора с поперечным электрическим полем в Саратовском филиале Института радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН был разработан и предложен новый биологический датчик с подавлением нежелательных колебаний путем частичного покрытия электродов демпфирующим слоем [21]. Датчик разработан для детекции

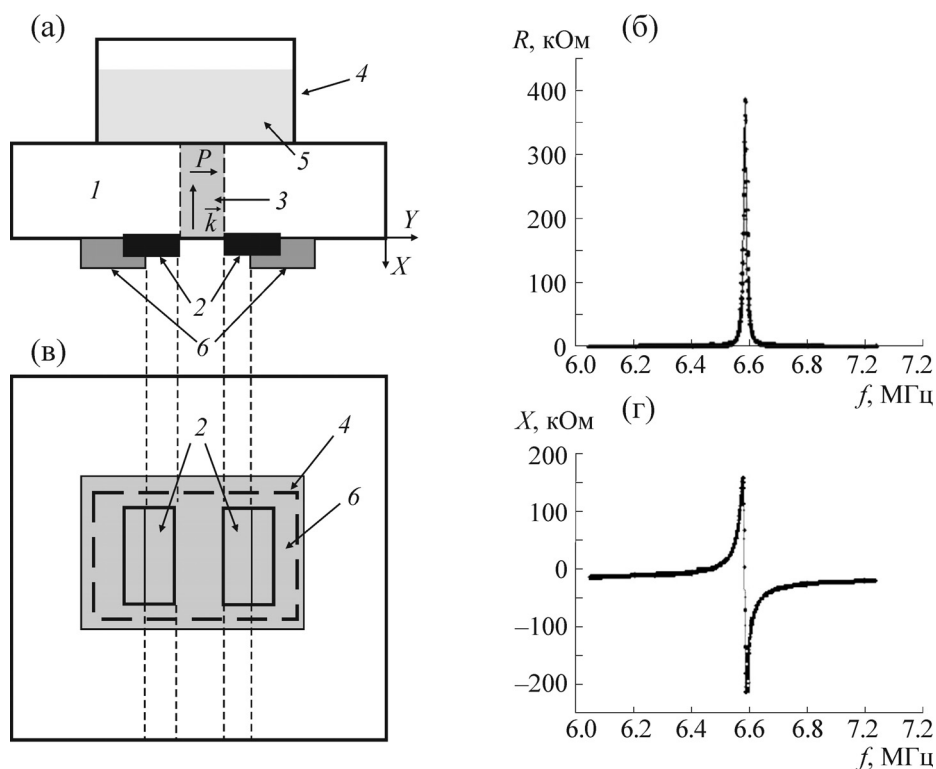


Рис. 1. Вид сбоку (а) и сверху (в) на биологический датчик: 1 – пьезоэлектрическая пластина, 2 – электроды, 3 – акустический луч, 4 – контейнер для суспензии, 5 – суспензия, 6 – слой поглощающего лака, k и P – направления волнового вектора и электрической поляризации соответственно, X и Y – кристаллографические оси пластины. Частотные зависимости реальной (б) и мнимой (г) частей электрического импеданса ненагруженного резонатора.

бактериальных клеток непосредственно в жидкой фазе путем регистрации специфических взаимодействий типа «бактериальные клетки – антитела», «бактериальные клетки – бактериофаги» и «бактериальные клетки – миниантитела». Далее остановимся на кратком описании конструкции разработанного датчика, особенностям проведения экспериментов с его помощью и физическим механизмам указанных взаимодействий.

На рис. 1 представлена схема используемого биосенсора, содержащего резонатор с двумя прямоугольными электродами на пластине ниобата лития X -среза и жидкостной контейнер. Присутствие контейнера объемом 1 мл никак не меняло характеристики резонатора, поскольку его поперечные размеры были существенно больше, чем область электродов. Исследования показали, что для указанной ориентации пластины стабильный резонанс наблюдается на продольной волне, распространяющейся вдоль оси X и возбуждаемой поперечными компонентами электрического поля. Электроды были сориентированы таким образом, чтобы поперечные компоненты поля были параллельны оси Y . Именно для такой их ориентации было по-

лучено максимальное значение добротности. Эти электроды, содержащие слои хрома (300 Å) и серебра (2000 Å) шириной 5 мм и длиной 10 мм, были нанесены на пластину ниобата лития через специальную маску в вакууме. Толщина пластины и зазор между электродами были равны 0,51 и 3,0 мм соответственно. Стороны пластины с поперечными размерами 25 × 25 мм были плоскими и параллельными. Продольная акустическая волна возбуждалась в пространстве между электродами и резонировала между сторонами пластины (рис. 1а,в). Определенная часть электродов, как показано на рис. 1а,в, была покрыта специальным быстро сохнущим лаком, чтобы подавить нежелательные колебания резонатора, связанные с возбуждением волн Лэмба. Ширина непокрытой части электродов ~ 4 мм, для которой паразитные колебания практически исчезали и добротность была максимальной, была определена экспериментально. Изучение резонатора проводилось путем измерения частотных зависимостей реальной и мнимой частей электрического импеданса с помощью прецизионного LCR-измерителя типа 4285A (Agilent, США). Рис. 1б,г показывает указанные зависимости для ненагру-

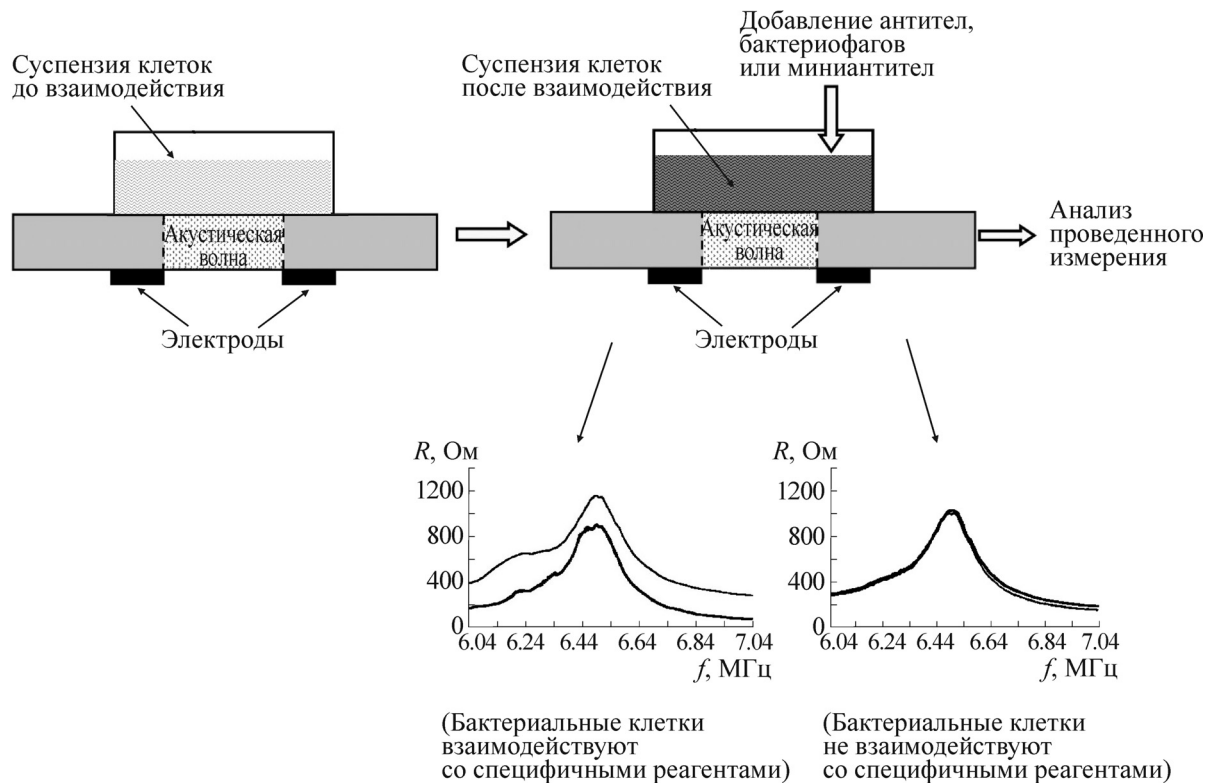


Рис. 2. Общая схема проведения электроакустического анализа.

женного резонатора. Значение его добротности оказалось равным ~ 630 при частоте $\sim 6,6$ МГц.

Идея экспериментов с использованием разработанного датчика основана на том, что электрофизические свойства клеток после их взаимодействия с биоселективными агентами (антителами, бактериофагами и миниантителами) будут меняться, вызывая соответствующие изменения физических параметров клеточной суспензии, что позволит идентифицировать присутствие микробных клеток в исследуемом образце. Общая схема проведения экспериментов представлена на рис. 2.

Проведенные исследования по апробации разработанного датчика позволили выделить несколько направлений, где он может быть успешно применен.

АНАЛИЗ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК АКУСТИЧЕСКИМ ДАТЧИКОМ С ПОПЕРЕЧНЫМ ЭЛЕКТРИЧЕСКИМ ПОЛЕМ

Детекция микробных клеток при их взаимодействии с антителами. Поверхность микробной клетки представляет собой набор сложных антигенных (АГ) комплексов. Разные виды микробов имеют различные видовые антигены, спе-

цифические для каждого вида, и типовые антигены, обуславливающие существование различных серологических типов внутри вида. Принцип взаимодействия антиген-антитело широко применяется в сенсорных системах для определения различных видов микроорганизмов [3,22,23]. Для оценки возможности регистрации взаимодействия антител с микробными клетками разработанным акустическим датчиком использовали поликлональные антитела (АТ), в качестве объекта исследования брали микробные клетки *Azospirillum brasilense* Sp7.

Среди основных антигенов бактериальной поверхности азоспирилл, как грамотрицательных микроорганизмов, особый интерес представляет липополисахарид или О-антиген. Строение его О-специфического полисахарида определяет иммунохимическую специфичность микроорганизмов, что служит основой для их внутривидовой классификации. Были исследованы изменения физических параметров суспензии клеток модельного штамма *A. brasilense* Sp7 при их взаимодействии с О-специфичными антителами при помощи вышеописанного биологического датчика при разных концентрациях клеток в суспензии (10^2 , 10^4 , 10^6 и 10^8 кл/мл) [24]. Для этого проводили измерения частотных зависимостей реальной и мнимой частей элек-

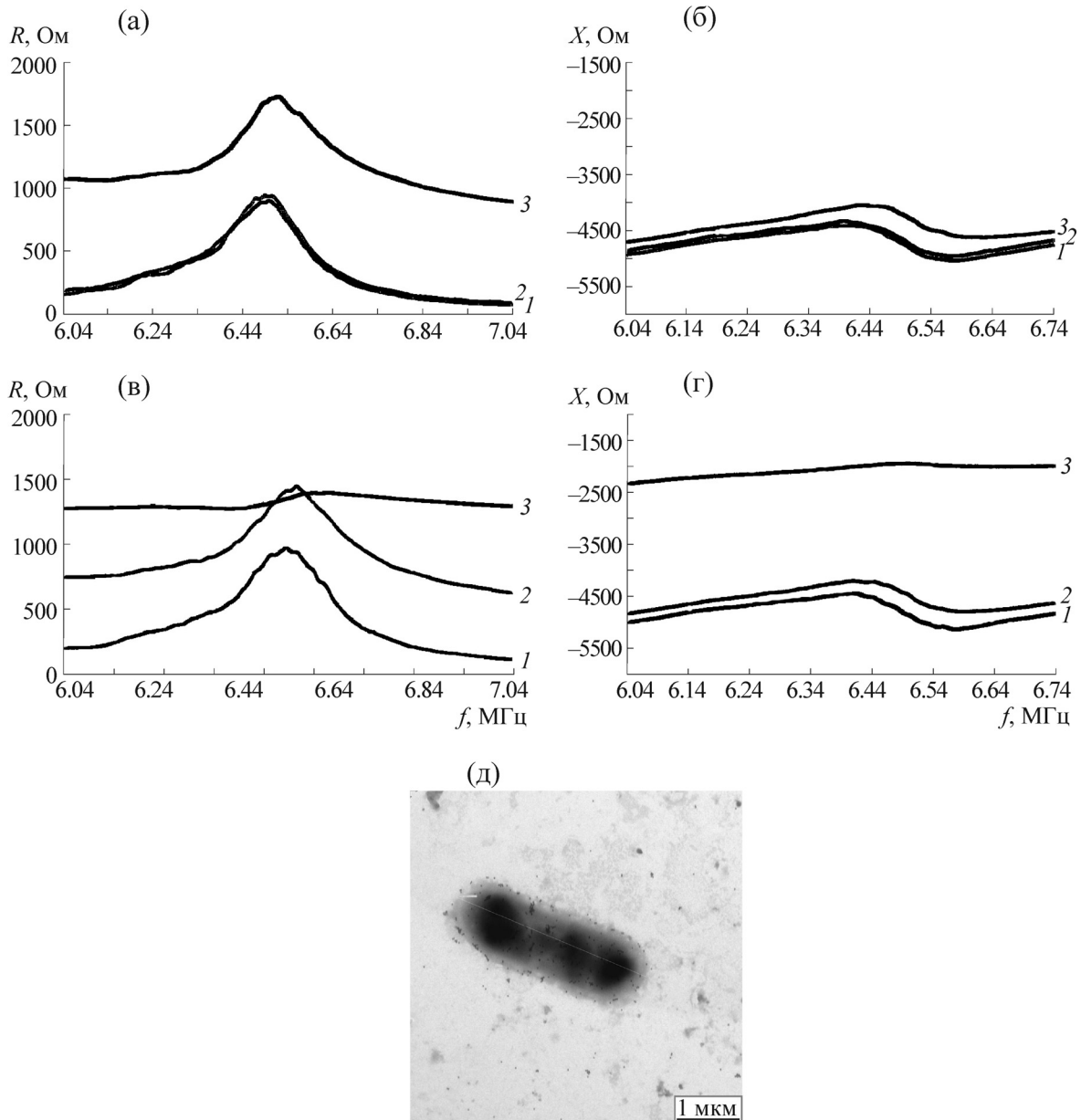


Рис. 3. Частотные зависимости реальной (а) и мнимой (б) части электрического импеданса резонатора (количество клеток в ячейке 10^4 кл/мл) при взаимодействии суспензии клеток *A. brasilense* Sp7 с антителами, специфичными к клеткам *A. brasilense* Sp7; реальной (в) и мнимой (г) части электрического импеданса резонатора смешанной суспензии клеток *A. brasilense* Sp7 и *E. coli* BL-Ril с антителами, специфичными к клеткам *A. brasilense* Sp7: 1 – дистиллированная вода; 2 – суспензия клеток без добавления антител; 3 – суспензия клеток с добавлением антител. (д) – Электронно-микроскопическое изображение бактерий *A. brasilense* Sp7, меченных конъюгатом протеина А с коллоидным золотом после взаимодействия клеток с антителами.

трического импеданса, когда в жидкостной ячейке находятся микробные клетки *A. brasilense* Sp7 без добавления антител и при добавлении специфичных антител (концентрация антител составляла 3,2 мкг/мл) [24].

На рис. 3 представлены измеренные частотные зависимости действительной (рис. 3а) и мнимой (рис. 3б) частей электрического импеданса датчика для чистой суспензии клеток с

минимальной определяемой концентрацией клеток и после их взаимодействия с антителами. В результате проведенного анализа продемонстрирована возможность детекции клеток при использовании специфичных антител, при этом нижний предел детекции составляет 10^4 кл/мл.

Одновременно проводились контрольные эксперименты по изучению неспецифического взаимодействия антител с клетками других мик-

роорганизмов, на примере клеток *E. coli* BL-Ril. Было установлено, что у суспензий клеток *E. coli* BL-Ril изменений значений реальной и мнимой частей импеданса при действии антител, специфичных к клеткам *A. brasilense* Sp7, не происходит. Однако при взаимодействии клеток *A. brasilense* Sp7 со специфичными антителами в присутствии посторонней микрофлоры (клеток *E. coli* BL-Ril) фиксируются изменения вышеупомянутых регистрируемых зависимостей (рис. 3в,г).

Дополнительно для контроля специфичности взаимодействия антител проводилась электронно-микроскопическая идентификация взаимодействия клеток *A. brasilense* Sp7 с используемыми антителами, мечеными коллоидным золотом. На микрофотографии видно, что полученные антитела взаимодействуют с клетками азоспириллы, причем скопление маркера происходит по всей поверхности клетки (рис. 3д).

Полученные зависимости позволяют сделать следующие выводы.

Во-первых, видно, что датчик позволяет четко разграничивать ситуации, когда происходит взаимодействие бактериальных клеток со специфичными антителами, от контрольных экспериментов, когда такое взаимодействие отсутствует.

Во-вторых, указанные зависимости показывают возможность использования в качестве аналитического сигнала значение действительной или мнимой части электрического импеданса на фиксированной частоте. Значение фиксированной частоты можно выбирать произвольно в некоторой окрестности вблизи резонансной частоты.

В целом полученные данные позволяют сделать некоторые выводы относительно изменения физических свойств суспензии клеток при добавлении антител.

Известно [25], что реакция между антителом и антигеном протекает в две стадии.

Первая стадия – специфическая, которая включает в себя непосредственное соединение активного центра антитела с антигенной детерминантой. Этот высокоспецифический процесс протекает в водных растворах с большой скоростью. О-антиген граммотрицательных бактерий связан с ЛПС клеточной стенки, при этом детерминантными группами этого сложного комплексного антигена являются концевые повторяющиеся звенья полисахаридных цепей, присоединенные к ее основной части. В момент связывания антителом детерминантной группы антигена возникает конформационная перестройка активного центра антитела и происхо-

дит адаптация активного антитела к антигену. Регистрация связывания антитела с антигенными детерминантами на клеточной поверхности производится по изменению поляризационных свойств комплекса АГ–АТ. Взаимодействие молекулы антигена с антителом или его активным Fab-фрагментом сопровождается, в свою очередь, изменениями пространственной структуры молекулы антигена (происходит глубокая перестройка третичной структуры антигена), что сказывается на изменении целостности бактериальных мембран и приводит к увеличению электрической проводимости суспензии клеток. Именно это увеличение проводимости регистрируется акустическим датчиком как увеличение реальной и мнимой частей электрического импеданса резонатора вблизи частоты параллельного резонанса.

Таким образом, регистрируемые в течение первых минут после добавления специфичных АТ в суспензию клеток изменения акустических параметров суспензии обусловлены специфической стадией взаимодействия АГ–АТ и конформационной перестройкой молекул АТ и АГ и электрофизических параметров поверхностных структур клетки.

Вторая стадия – неспецифическая. В этом случае отличающийся плохой растворимостью иммунный комплекс АГ–АТ выпадает в осадок, но клетки морфологически не изменяются, и, теряя подвижность, они остаются живыми. Следовательно, дальнейшие изменения вышеуказанных характеристик суспензии клеток после 5 мин воздействия на них специфичных антител обусловлены образованием конгломератов и второй (неспецифической) стадией реакции АГ–АТ. При этом процессы, протекающие в ходе этой стадии, не приводят к существенному изменению электрических свойств суспензии, что также подтверждается экспериментом [24].

Таким образом, увеличение электрической проводимости суспензии клеток при их взаимодействии со специфичными антителами обусловлено адсорбцией антител на клеточной поверхности и нарушением клеточной мембраны. Поскольку результаты электроакустического анализа хорошо согласуются с результатами, полученными с помощью электронной микроскопии, мы считаем, что использование акустического метода анализа для детекции микробных клеток путем регистрации специфического взаимодействия «бактериальные клетки – антитела» имеет большие перспективы для количественного анализа микробных клеток с нижним пределом детекции $\sim 10^4$ кл/мл.

Для того, чтобы с физической точки зрения понять, как увеличение проводимости суспензии

приводит к увеличению сопротивления резонатора, следует обратиться к его эквивалентной схеме. В простейшем случае эквивалентная схема резонатора с поперечным электрическим полем вблизи резонанса имеет вид (см. рис. 4). 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

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

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

где ω – круговая частота колебаний резонатора. Очевидно, что увеличение проводимости суспензии приводит к уменьшению сопротивления утечки R_2 . Из формул (1) и (2) следует, что при неизменных значениях ω , C и R_1 величины $\operatorname{Re}Z_{ab}$ и $\operatorname{Im}Z_{ab}$ при уменьшении R_2 будут увеличиваться, что и наблюдается в наших экспериментах, в которых происходит специфическое взаимодействие клеток с антителами.

Следует отметить, что все биологические процессы происходили в объеме суспензии без участия контактируемой поверхности резонатора. Это объясняется тем, что описываемый резонатор выполнен из кристалла ниобата лития, который является химически стойким практически ко всем химическим соединениям. Кроме того, поверхность резонатора, обработанная по 14-му классу чистоты, не допускает никакой адсорбции. Поэтому после промывки резонатора на его поверхности не остается никаких следов от суспензии, и подтверждением этому является полное восстановление всех его характеристик после всех экспериментов.

Детекция микробных клеток при их инфекции бактериофагами и определение фагоустойчивости бактерий. Наряду с использованием антител для определения микроорганизмов могут быть использованы бактериофаги. Бактериофаги обладают определенной селективностью взаимодействия с клеточной поверхностью, они являются очень точными индикаторами, определяющими видовую и типовую принадлежность бактерий. Поэтому они нашли широкое применение в медицинской практике для идентификации бактерий, выделяемых из организма больного и инфицированных объектов внешней среды [26,27]. Помимо специфичности большим преимуществом бактериофагов является относительная легкость их производства, надеж-

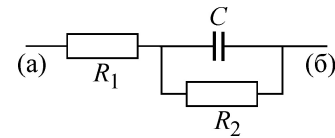


Рис. 4. Эквивалентная схема резонатора с поперечным электрическим полем вблизи резонанса, где R_1 – активное сопротивление, определяющее возбуждение акустической волны в резонаторе, C – емкость резонатора, R_2 – сопротивление утечки емкости резонатора, связанное с проводимостью суспензии.

ность и способность различать живые и мертвые клетки.

Например, были разработаны методики фагоиндикации бактерий и фагоидентификации бактерий *Escherichia coli* O157 с помощью реакции нарастания титра фага [28], а также клеток *Bacillus subtilis* в пищевом сырье и продуктах питания [29]. Широко используется способ идентификации бактерий *Pseudomonas mallei* возбудителей сапа с помощью бактериофагов *P. pseudomallei* с применением комбинаций бактериофагов [30]. Индикация микробных клеток на основе специфического связывания с бактериофагами показана для патогенных клеток, таких как *Bacillus cereus* и *Clostridium perfringens* [31], а также других бактерий [32–34].

Несмотря на то, что методы фаготипирования микробных клеток являются достаточно специфичными, простыми в постановке и общедоступными, они требуют больших временных затрат (время анализа составляет от 48 ч до 5 сут). Поэтому весьма актуальной является разработка альтернативных способов детекции бактерий с помощью бактериофагов с меньшим временем анализа.

Нами были проведены эксперименты по исследованию возможностей разработанного акустического датчика для детекции микробных клеток при их взаимодействии со специфичными бактериофагами [35]. 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, pHEN1, pUC18, pBR325 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 [36,37]. Процесс инфицирования фагом M13 клеток *E. coli*, содержащих F-пили, хорошо изучен [38,39].

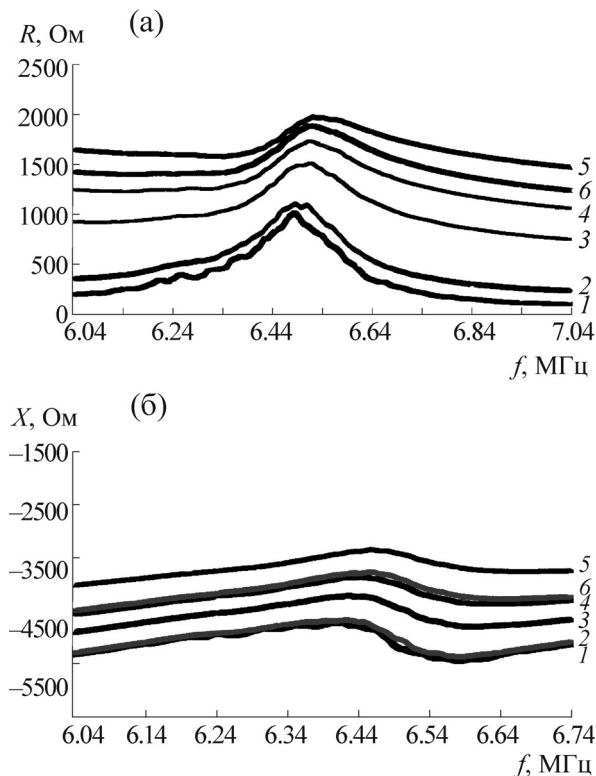


Рис. 5. Частотные зависимости реальной (а) и мнимой (б) частей электрического импеданса резонатора при взаимодействии клеток *E. coli* XL-1 с бактериофагом М13К07: дистиллированная вода (1); суспензия клеток без бактериофагов (2); суспензия клеток с добавлением бактериофага М13К07 в количестве: 5 фагов/клетку (3), 10 фагов/клетку (4), 20 фагов/клетку (5) 30 фагов/клетку (6).

Схема эксперимента была аналогична при использовании микробных клеток и специфичных антител (рис. 2). В результате проведенных исследований [35] показано, что разработанный датчик также позволяет разграничивать ситуации, когда происходит инфицирование бактериальных клеток специфичными бактериофагами от контрольных экспериментов, когда такого инфицирования не происходило. На рис. 5 для иллюстрации представлены реальные (рис. 5а) и мнимые (рис. 5б) части 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 фаговых частиц бактериофага М13К07 из расчета на одну бактериальную клетку. На этом же рисунке представлены соответствующие зависимости для дистиллированной воды и суспензии клеток без бактериофагов. Видно, что с увеличением удельного количества вносимого бактериофага в клеточную суспензию частотные зависимости как реальной, так и мнимой частей импеданса

поднимаются вплоть до концентрации 20 фагов/клетку и снижаются при последующем увеличении вносимых фаговых частиц. Эти данные свидетельствуют о чувствительности датчика к рассматриваемой биологической реакции. С физической точки зрения это объясняется следующим образом. При добавлении к суспензии клеток специфичного бактериофага электрическая проводимость суспензии возрастает [35] и это связано с тем, что взаимодействие бактериофагов с микробными клетками начинается с адсорбции фага на поверхности бактериальной клетки. Зафиксированные изменения частотных характеристик микробных клеток наблюдается уже после 5 мин взаимодействия бактериофага с индикаторной культурой, что, вероятно, обусловлено процессом адсорбции бактериофага на микробной клетке. При дальнейшем увеличении количества добавляемого бактериофага в суспензию клеток фиксируется монотонное увеличение реальной и мнимой частей электрического импеданса пьезоэлектрического резонатора вплоть до концентрации 20 фагов/клетку. Дальнейшее увеличение количества бактериофагов приводит к росту вязкости и соответствующему уменьшению электрического импеданса. Эти два противоположно направленные процесса [40] привели к тому, что кривые, соответствующие концентрациям 10 и 30 фагов/клетку, близки по полученным значениям. Таким образом, зафиксированные изменения в клетке-хозяине связаны с различными повреждениями внутриклеточных структур, обусловленными выходом вирусной ДНК в цитоплазму клеток-хозяина и процессами, происходящими в цитоплазме [38]. 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 [41]. 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 предыдущем подразделе, увеличение проводимости суспензии приводит к увеличению как реальной, так и мнимой частей электрического импеданса.

Следует отметить, что при использовании бактериофагов в качестве селективного агента при взаимодействии с клеточной поверхностью фиксируются изменения не только поверхностных структур клеток (в случае адсорбции бак-

териофага), а также изменения, происходящие в цитоплазме клеток, которые регистрируются при изменении электроакустических параметров в динамике воздействия бактериофагов на микробные клетки.

Дополнительно были проведены эксперименты, исключая неспецифическое взаимодействие бактериофага M13K07 с клетками *E. coli* штаммов XL-1, K-12, B-878, BL-Ril, pHEN1, pUC18, pBR325. Показано, что электроакустические параметры суспензии клеток *E. coli* штаммов XL-1 и K-12 при добавлении бактериофага M13K07 изменялись, т.е. данные микроорганизмы являются чувствительными к изучаемому бактериофагу. При этом для клеток *E. coli* штаммов B-878, BL-Ril, pHEN1, pUC18, pBR325, а также *P. putida* штаммов C-11 и BA-11 и *A. calcoaceticum* A-122 после добавления бактериофага M13K07 частотная зависимость импеданса практически не изменялась, т.е. микробные клетки данных штаммов являются устойчивыми к бактериофагу M13K07.

Одновременно было показано, что при взаимодействии клеток *E. coli* XL-1 с фагом M13K07 даже в присутствии посторонней микрофлоры клеток *E. coli* B-878, *E. coli* BL-Ril и *A. brasiliense* Sp7 происходит значительное изменение физических свойств суспензии, что приводит к изменению анализируемых частотных зависимостей реальной и мнимой частей электрического импеданса. Это означает, что датчик регистрирует взаимодействие бактериальных клеток и специфического бактериофага даже при наличии неспецифических взаимодействий.

Таким образом, специфические изменения параметров клеточных суспензий под действием бактериофага происходят только у микробных клеток, чувствительных к изучаемому бактериофагу, и электроакустический датчик позволяет разграничивать ситуации, когда происходит инфицирование бактериальных клеток специфическими бактериофагами от контрольных экспериментов, когда такое инфицирование отсутствует. Это позволило показать возможность использования метода электроакустического анализа не только для детекции микробных клеток, но и для определения спектра литической активности бактериофагов [35]. 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 ~10% при добавлении в суспензию клеток минимального количества бактериофагов (пять фаговых частиц на клетку) [35]. Изучены изменения физических параметров суспен-

зии клеток при взаимодействии с бактериофагами, как в чистой культуре, так и в смешанной суспензии клеток. Полученные результаты могут быть использованы для создания экспресс-метода детекции микробных клеток при их инфекции специфическим бактериофагом и определения их бактериофагоустойчивости.

Детекция микробных клеток при их взаимодействии с миниантителами. Традиционно биологическими компонентами, используемыми для определения клеток, являются поликлональные и моноклональные антитела, которые широко применяются в производстве диагностических тест-систем. Тем не менее в последнее время для решения задач детекции микробных клеток стали использоваться генно-инженерные технологии клонирования узнающих фрагментов – гипервариабельных участков иммуноглобулинов, которые являются более дешевыми и могут конкурировать по селективности с гибридными технологиями. Таким образом, бактериофаги используются не как агенты детекции, а как промежуточные факторы для продукции высокоспецифичных молекул связывания и распознавания антителом исследуемого организма. Одним из таких методов является метод фагового дисплея антител. О фаговом дисплее впервые сообщил в 1985 г. Дж.Р. Смит, который продемонстрировал, что фрагменты пептида могут быть представлены на поверхности бактериофагов [42]. Фаговый дисплей был впервые описан в 1990 г. в работе [43] как способ получения антител, который с тех пор стал широко используемым подходом. Авторы этой работы на примере антител против лизоцима продемонстрировали возможность высокоэффективной аффинной селекции клонов, несущих антигенсвязывающие одноцепочечные АТ (мини-антитела). В дальнейшем были сконструированы библиотеки, в которых комбинации легких и тяжелых цепей АТ продуцировались в составе фагового белка в виде одноцепочечных АТ, гетеродимеров или отдельных растворимых молекул. Основой метода является создание комбинаторной библиотеки, в которой вариабельные участки легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов соединены случайным образом и представлены на поверхности нитевидного бактериофага [44]. Каждый бактериофаг экспрессирует антитела единственной специфичности. Фаги, несущие антигенсвязывающие фрагменты антител (scFv, Fab) нужной специфичности, могут быть отобраны на иммобилизованном антигене. В технологии фагового дисплея чаще всего используют нелизирующие нитевидные бактериофаги (M13, f1, fd и др.) [45]. Их вирион содержит кольцевую

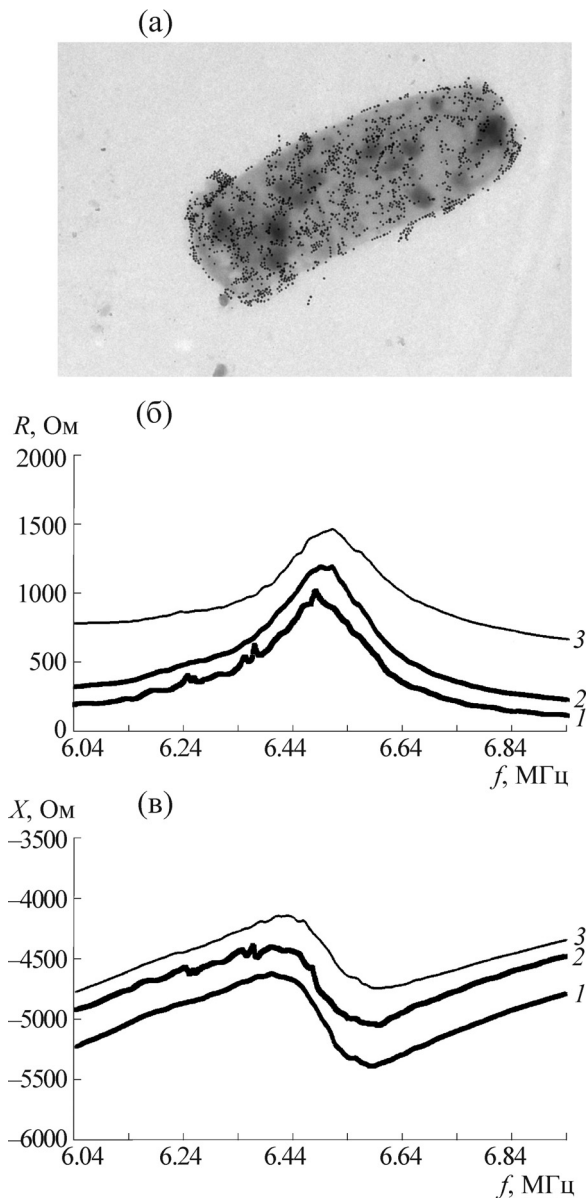


Рис. 6. Электронно-микроскопическое изображение бактерий *A. brasilense* Sp245, меченных конъюгатом антифаговых АТ с КЗ после взаимодействия клеток с мини-антителами (а); зависимости реальной (б) и мнимой (в) части электрического импеданса от частоты (количество клеток в ячейке 10^3 кл/мл) при взаимодействии клеток *A. brasilense* Sp245 с мини-антителами: 1 – дистиллированная вода; 2 – суспензия клеток без добавления мини-антител; 3 – суспензия клеток с добавлением мини-антител.

одноцепочечную ДНК, генетическая организация и последовательность которой известна для многих представителей данной группы бактериофагов. Во всех сконструированных к настоящему времени фаговых библиотеках фрагменты антител экспрессируются в составе гибридных белков на основе капсидного белка g3p.

К достоинствам метода фагового дисплея можно отнести относительную простоту получения мини-антител, высокую специфичность и их низкую себестоимость, а также возможность создания гибридных молекул антител с маркерными белками. Технология фагового дисплея позволяет изолировать антитела с достаточной связывающей способностью при любых физиологических условиях. Антитела, полученные с помощью технологии фагового дисплея, успешно используются для идентификации бактерий [46–51].

В работе [52] показана возможность использования аффинно-селективного нитчатого бактериофага в качестве зонда для детекции клеток *S. typhimurium* с помощью сконструированного акустического биосенсора [52,53]. Нитчатые бактериофаги, специфичные к *S. typhimurium*, полученные из фаговой библиотеки, адсорбируются на поверхности сенсора, и внесение бактериальных клеток на поверхность кварцевого резонатора приводит к изменению частоты резонанса, что регистрируется прибором. Биосенсор позволяет осуществлять детекцию клеток при их количестве 10^2 кл/мл, при этом результат фиксируется менее чем за 180 с. Преимущества использования бактериофагов в данном методе по сравнению с использованием антител включает низкую стоимость производства, продолжительность срока службы, повторность использования и стабильность, а также высокую специфичность и чувствительность.

В 1999 г. в ИБФРМ РАН в ходе выполнения совместного научного проекта с Университетом г. Абердина (Великобритания) были переданы фаговый дисплей АТ овцы и соответствующие протоколы, а также методические рекомендации по применению данной технологии [54]. Раунды аффинной селекции (биопаннинга) повторяются, как правило, от трех до шести раз. Нами были проведены три раунда селекции мини-антител на целые клетки *A. brasilense* Sp245 с использованием клонов, обладающих более высокой чувствительностью и продукционной активностью. Одновременно для контроля специфичности взаимодействия мини-антител проводилась электронно-микроскопическая идентификация взаимодействия клеток *A. brasilense* Sp245 с используемыми мини-антителами, мечеными КЗ. На электронной микрофотографии видно, что мини-антитела с КЗ взаимодействуют с клетками азоспириллы, причем скопление маркера происходит по всей поверхности клетки (рис. 6а).

Далее полученные мини-антитела использовались для детекции микробных клеток с помощью разработанного электроакустического

датчика на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем [55].

При помощи этого датчика были исследованы суспензии бактериальных клеток *A. brasilense* Sp245 при их взаимодействии с полученными мини-антителами. На рис. 6б,в показано, что значения резонансной частоты, а также частотные зависимости реальной и мнимой частей импеданса сильно отличаются для суспензий клеток с мини-антителами (кривая 3) и без них (кривая 2). Следует отметить, что в ходе измерений не было замечено изменений импеданса резонатора после ~10 мин, т.е. скорость изменения импеданса была достаточно высокой. Указанные измерения фиксировали конечное состояние суспензии, поскольку повторные эксперименты приводили к тем же самым результатам. Было установлено, что детекция клеток *A. brasilense* Sp245 с помощью мини-антител возможна также в присутствии посторонних культур, например клеток *E. coli* BL-Ril и *A. brasilense* Sp7.

В данном случае также происходило увеличение электрической проводимости суспензии клеток при добавлении специфических мини-антител, которое обуславливалось их адсорбцией на поверхности клеток и нарушением клеточной мембраны, что подтверждено результатами электронной микроскопии. Полученные результаты с физической точки зрения аналогичны данным, полученным при использовании в качестве селективного агента специфичных антител.

Проведенные исследования показали возможность детекции клеток при использовании специфичных мини-антител, причем предел детекции составляет примерно 10^3 кл/мл. При этом степень изменения характеристик резонатора зависит от концентрации клеток, что открывает возможность проведения не только качественного, но и количественного анализа бактерий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, продемонстрированы возможности электроакустического биологического датчика на основе резонатора с поперечным электрическим полем для исследования суспензий бактериальных клеток на примерах *Azospirillum brasilense* Sp7 [24], *Escherichia coli* штамма XL-1 [35], *Azospirillum brasilense* Sp245 [55] и при их взаимодействии со специфичными поликлональными антителами, бактериофагами и миниантителами соответственно. Показано, что датчик позволяет четко разграничивать ситуации, когда происходит взаимодействие бак-

териальных клеток со специфичными реагентами от контрольных экспериментов, когда такого взаимодействия не происходило. Во всех случаях определена чувствительность детекции микробных клеток, которая составила $\sim 10^3$ – 10^4 кл/мл. Установлена возможность использования биологического датчика для детекции бактериальных клеток при их взаимодействии со специфичными реагентами в присутствии посторонней микрофлоры. Поскольку результаты электроакустического анализа хорошо согласуются с результатами электронной микроскопии и стандартными микробиологическими методами контроля, с нашей точки зрения, существует принципиальная возможность использования разработанного акустического датчика для детекции микробных клеток, определения их устойчивости к бактериофагам и оценки параметров связывания бактериофагов, антител и миниантител с бактериальными клетками.

Описанный метод имеет ряд преимуществ с уже используемыми методами акустического анализа, поскольку не требует иммобилизации специфических реагентов на поверхности резонатора, как описано в работах [7,56].

Кроме того, описанный метод является прижизненным, так как не требует использования дополнительных меток или химических компонентов, при этом воздействие на бактериальные клетки измерительной процедуры также незначительно. Метод является достаточно оперативным, так как время анализа составляет около 10 мин, при этом процесс измерений может быть полностью автоматизирован. Оптимальным информативным параметром для получения достоверной информации является регистрация изменений реальной и мнимой частей электрического импеданса при внесении в суспензию клеток специфических агентов. Для определения критерия специфического взаимодействия следует принимать во внимание не одну резонансную частоту, а набор частот в определенном диапазоне вблизи резонансной частоты. Описанный метод может дать полезную информацию и относительно биофизических аспектов взаимодействия в популяции микроорганизмов.

Таким образом, разработанный датчик является весьма перспективным для использования в микробиологии, медицине, ветеринарии для решения вопросов детекции и идентификации микробных клеток и определения их фагоустойчивости.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 16-07-00818).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. O. I. Guliy, L. Yu. Matora, G. L. Burygin, et al., *Anal. Biochem.* **370**, 201 (2007).
2. O. I. Guliy, V. D. Bunin, D. O'Neil, et al., *Ignatov, Biosens. Bioelectron.* **23**, 583 (2007).
3. A. E. Yousef, in: *Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and microsystems* (Springer, New York; 2008), pp. 31–48.
4. J. M. Van Emon, C. L. Gerlach, and J. C. Johnson, *Environmental Immunochemical Methods* (ACS, Washington, DC; 1995).
5. F. Basile, M. B. Beverly, and K. J. Voorhees, *Trends Anal. Chem.* **17**, 95 (1998).
6. J. Andle and J. Vetelino, *J. Sensors and Actuators A* **44**, 167 (1994).
7. D. S. Ballantine, R. M. White, S. J. Martin, et al., *Acoustic Wave Sensors: Theory, Design, and Physico-chemical Applications* (Acad. Press, San Diego, 1997).
8. C. E. Reed, K. K. Kanazawa, and J. H. Kaufman, *J. Appl. Phys.* **68**, 1993 (1990).
9. S. J. Martin, G. C. Frye, and K. O. Wessendorf, *J. Sensors and Actuators A* **44**, 209 (1994).
10. J. Auge, P. Hauptmann, F. Eichelbaum, and S. Rosler, *J. Sensors and Actuators B* **18–19**, 518 (1994).
11. J. Auge, P. Hauptmann, J. Hauptmann, et al., *J. Sensors and Actuators B* **24–25**, 43 (1995).
12. W. H. King, *J. Bull. N. Y. Acad. Med.* **48**, 459 (1972).
13. T. N. Ermolaeva and E. N. Kalmykova, in: *Advances in immunoassay technology*, Ed. by N. H. L. Chiu and Th. K. Christopoulos (In TeO, 2012).
14. T. N. Ermolaeva and E. N. Kalmykova, *J. Rus. Chem. Rev.* **55**, 397 (2006).
15. M. Wark, B. Kalanyan, and L. Ellis, in: *Proc. IEEE Ultrason. Symp.* (2007), pp. 1217–1220.
16. W. Pinkham, M. Wark, and S. Winters, in: *Proc. IEEE Ultrason. Symp.* (2005), pp. 2279–2283.
17. C. York, L. A. French, P. Millard, and J. F. Vetelino, in: *Proc. IEEE Ultrason. Symp.* (2005), pp. 44–48.
18. J. F. Vetelino, in: *Proc. IEEE Ultrason. Symp.* (2010), pp. 2269–2272.
19. H. Handa, S. Gurczynski, M. P. Jackson, et al., *Syrf. Sci.*, **602**, 1393 (2008).
20. Б. Д. Зайцев, И. Е. Кузнецова, А. М. Шихабудинов и А. А. Васильев, *Письма в ЖТФ* **37**, 27 (2011).
21. B. D. Zaitsev, I. E. Kuznetsova, A. M. Shikhabudinov, et al., *Trans. on Ultrason., Ferroel. and Freq. Contr.* **59** (5), 963 (2012).
22. R. D. Vaughan, C. K. O'Sullivan, G. G. Cuilbault, *J. Enzyme Microb. Technol.* **29**, 635 (2001).
23. P. Gascoyne, R. Pethig, J. Satayavivad, et al., *J. Biophys. Acta* **1323**, 240 (1997).
24. О. И. Гулий, Б. Д. Зайцев, И. Е. Кузнецова и др., *Микробиология* **82**, 218 (2013).
25. *Иммунология*, под ред. У. Пола (Мир, М., 1987), т. 1. ISBN 5-03-001444-6
26. S. Jung, K. M. Arndt, K. M. Mӕller, and A. Pӕckthun, *J. Immunol. Methods* **231**, 93 (1999).
27. W. S. Summers, *Bacteriophage research: Early history in Bacteriophages: Biology and Applications*, Ed. by E. Kutter and A. Sulakvelidze (CRP Press, FL, 2005).
28. Н. И. Молофеева, Дис. ... канд. биол. наук (Саратов, 2004).
29. А. Х. Мустафин, Дис. ... канд. биол. наук (Саратов, 2012).
30. О. Ю. Манзенюк, Н. В. Воложанцев и Э. А. Светоч, *Микробиология* **63**, 537 (1994).
31. J. W. Kretzer, R. Lehmann, M. Schmelcher, et al., *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 1992 (2007).
32. L. Y. Low, C. Yang, M. Perego, et al., *J. Biol. Chem.* **280**, 35433 (2005).
33. M. Schmelcher, In: *Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and Microsystems* (Springer Science + Business Media, LLC, 2008), pp. 731–754.
34. S. Chatterjee, M. Mitra, and S. Kr. Das Gupta, *FEMS Microbiol. Lett.* **188**, 47 (2000).
35. О. И. Гулий, Б. Д. Зайцев, И. Е. Кузнецова и др., *Биофизика* **60**, 722 (2015).
36. D. A. Marvin, R. D. Hale, C. Nave, and M. Helmer-Citterich, *J. Mol. Biol.* **235**, 260 (1994).
37. S. A. Overman, M. Tsuboi, and G. J. Thomas, *J. Mol. Biol.* **259**, 331 (1996).
38. E. M. Click and R. E. Webster, *J. Bacteriol.* **179**, 6464 (1997).
39. L. W. Deng, P. Malik, and R. N. Perham, *Virology* **253**, 271 (1999).
40. Б. Д. Зайцев, А. М. Шихабудинов, А. А. Теплых и И. Е. Кузнецова, *Уч. записки физич. ф-та МГУ*, **5**, 145330 (2014).
41. H. Endemann and P. Model, *J. Mol. Biol.* **250** (4), 496 (1995).
42. G. P. Smith, *Science* **228**, 1313 (1985).
43. J. McCafferty, A. D. Griffiths, G. Winter, and D. J. Chiswell, *Nature* **348**, 552 (1990).
44. J. Pande, M. M. Szewczyk, and A. K. Grover, *Biotechnol. Adv.* **28**, 849 (2010).
45. S. Ripp, *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.* **118**, 65 (2010).
46. G. P. Smith and V. A. Petrenko, *Chem. Rev.* **97**, 391 (1997).
47. V. A. Petrenko and I. B. Sorokulova, *J. Microbiol. Methods* **58**, 147 (2004).
48. V. A. Petrenko, *J. Microbiol. Methods* **53**, 253 (2003).
49. D. D. Williams, O. Benedek, and C. L. Turnbough Jr., *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 6288 (2003).
50. V. Nanduri, I. B. Sorokulova, A. M. Samoylov, et al., *Biosens. Bioelectron.* **22**, 986 (2007).
51. G. C. Paoli, C. Y. Chen, and J. D. Brewster, *J. Immunol. Methods* **289**, 147 (2004).
52. E. V. Olsen, I. B. Sorokulova, V. A. Petrenko, et al., *Biosens. Bioelectron.* **21**, 1434 (2006).
53. S. Ripp, P. Jegier, and C. M. Johnson, *Anal. Bioanal. Chem.* **391**, 507 (2008).
54. K. A. Charlton, S. Moyle, A. J. R. Porter, and W. J. Harris, *J. Immunol.* **164**, 6221 (2000).

55. О. И. Гулий, Б. Д. Зайцев, И. Е. Кузнецова и др., *Биофизика* **57**, 460 (2012).
56. В. Koenig and M. Graetzel, *Anal. Chem.* **66**, 341, (1994).

The Acoustic Method for Bacterial Cells Analysis

O.I. Guliy* ** *, B.D. Zaitsev****, I.A. Borodina****,
A.A. Teplykh****, and O.V. Ignatov***

**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 Strelkovoi Divizii 6, Saratov, 410028 Russia*

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

The work demonstrates the possibility of biological electroacoustic sensor on the basis of a resonator with a lateral electric field in order to study bacterial cell suspensions by interacting with specific bacteriophages, miniantibodies and polyclonal antibodies. The sensitivity of detecting microbial cells is found to be about $\sim 10^3$ – 10^4 cells/ml and the analysis takes no longer than 10 min. The capability of detecting bacterial cells by interacting with specific agents is shown in the presence of extraneous microflora. The described method allows us to determine the spectrum of lytic activity of bacteriophages and the sensitivity of microbial cells to bacteriophages. The results presented show prospects of using the sensor on the basis of a resonator with a lateral electric field for solution of problems of detection and identification of microbial cells and determination of their phage resistance in microbiology, medicine, veterinary medicine. Furthermore, the results of the experiments allowed us to achieve a clear physical pattern of the processes that occur in the suspension of bacterial cells in the presence of diverse biological agents. Also, the described method may give us useful information on biophysical aspects of interactions among microbial populations.

Key words: method of acoustic analysis, detection, microbial cells, bacteriophages, antibodies, lateral electric-field-excited piezoelectric resonator