

## ДЕТЕКЦИЯ БАКТЕРИИ РОДА *AZOSPIRILLUM* С ПОМОЩЬЮ БАКТЕРИОФАГОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* ШТАММОВ SP7 И SR75

Гулий О.И. \*, Караваяева О.А. \*, Макарихина С.С. \*,  
Павлий С.А. \*\*, Игнатов О.В. \*

\*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт  
биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов

\*\*Национальный исследовательский Саратовский государственный  
университет им. Н.Г. Чернышевского

Тел.: 8(8452)970444, e-mail:guliy\_olga@mail.ru

**Ключевые слова:** *Azospirillum brasilense*, бактериофаг, детекция.

Работа посвящена исследованию возможности применения бактериофагов, выделенных из почвенных микроорганизмов *Azospirillum brasilense* штаммов Sp7 и SR75, для детекции клеток *Azospirillum* с помощью метода электрооптического (ЭО) анализа микробных суспензий. При проведении исследований авторами определен минимальный предел детекции клеток, который составляет  $10^4$  клеток/мл. Установлена возможность использования метода электрооптического анализа микробных суспензий для детекции клеток азоспирилл при их взаимодействии со специфическими бактериофагами в присутствии посторонней микрофлоры

**Введение.** Одной из актуальных проблем современной биотехнологии является разработка новых подходов для детекции бактерий с помощью бактериофагов [1-2]. Этому вопросу посвящено сравнительно большое количество научных статей, однако, развитию методов детекции почвенных микроорганизмов, уделяется недостаточное внимание, хотя роль этих микроорганизмов весьма значительна как для развития фундаментальных исследований, так и для современной сельскохозяйственной биотехнологии.

Перспективным направлением исследований является выделение и изучение бактериофагов почвенных микроорганизмов, в том числе бактериофагов *Azospirillum brasilense*, а также разработка новых методов индикации почвенных бактерий с помощью бактериофагов.

Целью работы являлось изучение возможности применения бактериофагов, выделенных из *Azospirillum brasilense* штаммов Sp7 и SR75 для детекции бактерий рода *Azospirillum* с помощью метода электрооптического анализа микробных суспензий.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### Микроорганизмы.

В работе использовали микроорганизмы *A. brasilense* штаммов Sp7, Cd, Sp107, Sp245, Jm6B2, Br14, KR77, S17, S27, SR55, SR75, *A. amazonense* Am14, *A. halopraeferans* Au4, *A. irakense* штаммов KBC1, KA3, *A. lipoferum* штаммов Sp59b, SR65, RG20a, *Escherichia coli* штаммов B-878, XL-1, из коллекции культур Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (ИБФРМ РАН) (Саратов). Микроорганизмы хранились при +4°C на чашках Петри с картофельным агаром (3%) и пересеивались каждые 2 недели.

**Условия культивирования микробных клеток:** культуры бактерий выращивали в 250 мл колбах Эрленмейера на жидкой среде LB [3] – следующего состава (г/л): NaCl (Becton, Dickinson and Company, Франция) – 10,0, пептон (Becton, Dickinson and Company, Франция)

– 5,0, дрожжевой экстракт (DIFCO, США) – 5,0. Инкубирование клеток осуществляли на круговой качалке при интенсивности перемешивания 160 об/мин при температуре  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 18-20 ч.

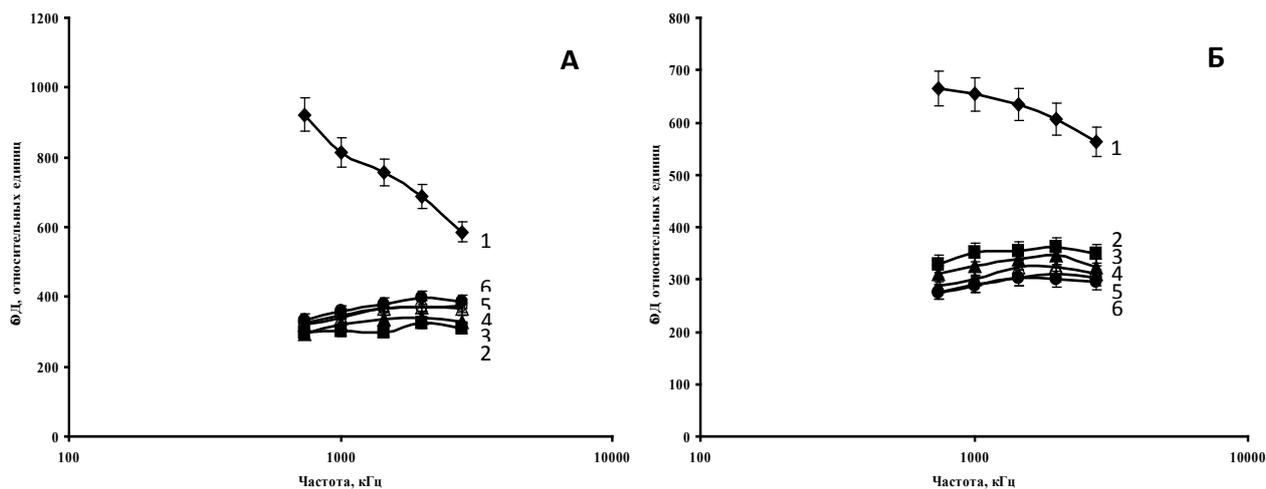
**Методы.** В ходе выполнения работы применяли традиционные методы культивирования микроорганизмов на питательных средах [4]. Выделение бактериофагов проводили методами, предложенными [4]. Инфицирование клеток бактериофагом проводили согласно [5]. Изучение электрооптических параметров суспензий клеток *A. brasilense* штаммов Sp7 и SR75 с использованием выделенных бактериофагов проводили согласно методике [5].

Кривые на рисунках строились по средним значениям, полученным в результате не менее 5 повторностей. Статистическую обработку результатов измерений проводили стандартным методом [6]. Для статистической обработки экспериментальных данных также использовали пакет прикладных программ Microsoft Excel 2000.

**Результаты и обсуждение.** Для выполнения исследований использовали бактериофаги, выделенные из клеток *Azospirillum brasilense* штаммов Sp7 и SR75 [7]. Изучалась возможность использования выделенных бактериофагов для детекции клеток азоспирилл с помощью метода электрооптического (ЭО) анализа клеточных суспензий. Методы ЭО анализа микробных суспензий основаны на регистрации изменения оптических свойств микробной суспензии под влиянием переменного электрического поля. При воздействии на бактериальные клетки антителами [8] и вирусами [5] происходит изменение ЭО параметров бактериальных суспензий. И наоборот, если вещество или частица присутствует в среде роста, но не взаимодействует с клетками, изменения величины ЭО параметров не происходит [5; 8; 9; 10].

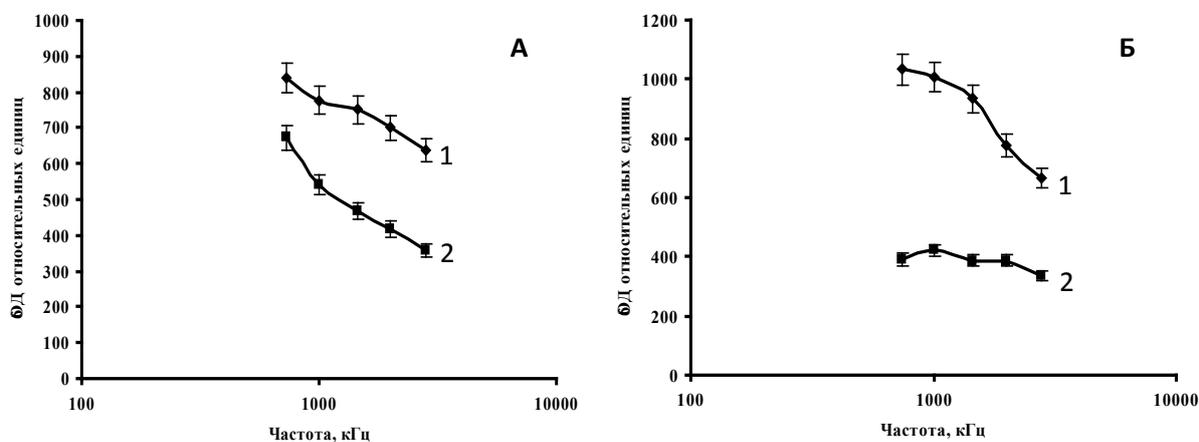
Первоначально проводилась оптимизация условий измерения ЭО параметров суспензии клеток *A. brasilense* штаммов Sp7 и SR75, которая включала в себя напряженность электрического поля 17 В/см при времени приложения электрического поля 16 сек и проведение измерений на частотах 740, 1000, 1450, 2000 и 2800 кГц. Электропроводность воды во всех случаях составляла  $1,6 \mu\text{S/m}$ . В предварительных экспериментах было показано, что изменение величины ЭО сигнала происходит при внесении бактериофага из расчета 20 бактериофагов на 1 бактерию, поэтому мы использовали те же условия.

Далее изучали динамику изменений величины ЭО сигнала суспензии клеток *A. brasilense* Sp7 и *A. brasilense* SR75 при их инфицировании бактериофагами ФAb-Sp7 и ФAb-SR75. Для этого в суспензию клеток *A. brasilense* Sp7 и *A. brasilense* SR75 ( $10^8$  клеток/мл) вносили соответствующий бактериофаг, затем проводили инкубацию при температуре  $37^\circ\text{C}$  в течение 1, 5, 10, 20 и 30 минут. При инфицировании клеток *A. brasilense* штаммов Sp7 (рис. 1 (А)) и SR75 (рис. 1 (Б)) соответствующими бактериофагами наблюдалось изменение величины ЭО сигнала уже через 1 мин от начала инфекции, что, вероятно, связано с адсорбцией бактериофага на поверхности клетки. Следует отметить, что изменения величины ЭО сигнала суспензий клеток *A. brasilense* штаммов Sp7 и SR75 после 5, 10, 20 и 30 мин от начала инфекции клеток бактериофагом фиксировались в пределах 5%.



**Рис. 1.** - Динамика изменений ОС суспензии клеток *A. brasilense* Sp7 (А) при добавлении бактериофага ФАб-Sp7 и суспензии клеток *A. brasilense* SR75 (Б) при добавлении бактериофага ФАб-SR75: (1) – контроль – суспензия клеток без бактериофагов; время от начала инфекции: (2) –1 мин; (3) – 5 мин; (4) –10 мин; (5) –20 мин; (6) – 30 мин

Одним из важных параметров при развитии нового метода детекции клеток является определение минимального количества детектируемых клеток. Поэтому проводили измерения при количестве клеток в ячейке  $10^6$ ,  $10^4$  и  $10^2$  клеток/мл. Установлено, что предел детекции микробных клеток *A. brasilense* штаммов Sp7 (рис. 2 (А)) и SR75 (рис. 2 (Б)) при их инфекции бактериофагами ФАб-Sp7 и ФАб-SR75 с помощью метода электрооптического анализа микробных суспензий составляет  $10^4$  клеток/мл.

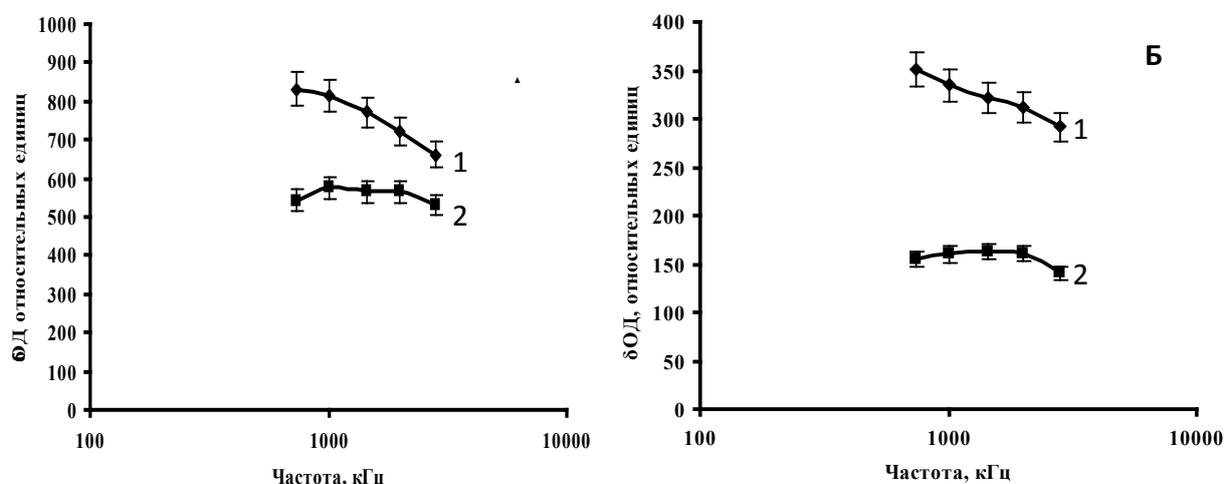


**Рис. 2.** - Изменение величины ЭО сигнала суспензии клеток *A. brasilense* Sp7 (А) при их инфекции бактериофагом ФАб-Sp7 и *A. brasilense* SR75 (Б) при их инфекции бактериофагом ФАб-SR75. Количество клеток в ячейке –  $10^4$  клеток/мл. (1) – контроль – суспензия клеток без добавления бактериофагов; (2) – суспензия клеток с добавлением бактериофагов

Важным этапом в развитии метода детекции клеток является получение аналитического сигнала при наличии мешающих факторов и, прежде всего, в присутствии посторонней микрофлоры. Поэтому нами проводились измерения ЭО параметров суспензии клеток *A. brasilense* штаммов Sp7 и SR75 при их инфекции бактериофагами ФАб-Sp7 и ФАб-SR75, соответственно, в присутствии клеток *E. coli* штаммов B-878 и XL-1.

Для этого к смешанной суспензии *A. brasilense* Sp7, *E. coli* B-878 и *E. coli* XL-1 и смешанной суспензии *A. brasilense* SR75, *E. coli* B-878 и *E. coli* XL-1 (количество клеток в измерительной ячейке  $10^4$  клеток/мл, взятых в равном соотношении (1:1:1), вносили определенный бактериофаг. В качестве контроля использовалась смешанная суспензия *A. brasilense* Sp7, *E. coli* B-878 и *E. coli* XL-1 без внесения бактериофага. В результате было показано, что при инфекции клеток *A. brasilense* штамма Sp7 бактериофагом ФАб-Sp7 (рис. 3 (А)) и клеток штамма SR75 бактериофагом ФАб-SR75 (рис. 3 (Б)) в присутствии клеток *E. coli* B-878 и *E. coli* XL-1, происходит значительное снижение величины ЭО сигнала.

Дополнительно проводились контрольные эксперименты по изучению неспецифического взаимодействия бактериофагов ФАб-Sp7 и ФАб-SR75 с клетками *E. coli* штаммов B-878 и XL-1, при этом было показано, что изучаемые бактериофаги не инфицируют клетки *E. coli* штаммов B-878 и XL-1.



**Рис. 3. - (А) Изменение величины ЭО сигнала смешанной суспензии клеток *E. coli* B-878 + *E. coli* XL-1 + *A. brasilense* Sp7 при добавлении бактериофага ФАб-Sp7; (Б) суспензий клеток *E. coli* B-878 + *E. coli* XL-1 + *A. brasilense* SR75, при добавлении бактериофага ФАб-SR75. (1) – контроль – суспензия клеток без добавления бактериофагов; (2) – суспензия клеток с добавлением бактериофагов**

Полученные результаты показывают возможность использования бактериофагов ФАб-Sp7 и ФАб-SR75 для детекции микробных клеток с помощью метода электрооптического анализа клеточных суспензий в присутствии посторонней микрофлоры.

Таким образом, в результате проведенных исследований показана возможность детекции микробных клеток азоспирилл при их инфекции специфическим бактериофагом с помощью метода электрооптического анализа микробных суспензий. Определен минимальный предел детекции клеток, который составляет  $10^4$  клеток/мл. Установлена возможность использования метода электрооптического анализа микробных суспензий для детекции клеток азоспирилл при их взаимодействии со специфическими бактериофагами в присутствии посторонней микрофлоры

Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашение №8852 «Разработка методологии и приборного обеспечения электрооптического анализа вирусов микроорганизмов» (номер заявки в информационной компьютеризированной системе 2012-1.5-14-000-2021-004 (2012-2013 гг.)

**Библиографический список**

- 1 Schofield D. A., Sharp N. J., Westwater C. Phage-based platforms for the clinical detection of human bacterial pathogens // *Bacteriophage*. 2012. Vol. 1;2(2). P.105-283.
2. Schofield DA, Molineux IJ, Westwater C. Rapid identification and antibiotic susceptibility testing of *Yersinia pestis* using bioluminescent reporter phage.// *J Microbiol Methods*. 2012. Vol. 90(2). P.80-82.
3. Sambrook J., Fritsch D.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. (v.1–3). Cold Spring Harbor; New York; Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. – 1659 p.
4. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: Пер с англ. – М.: Мир, 1984. – 480 с.
5. Bunin V.D., Ignatov O.V., Guliy O.I., Zaitseva I.S., Dykman L.A., O’Neil D., Ivnitiski D. Electro-optical analysis of the *Escherichia coli*–phage interaction. // *Anal. Biochem.* – 2004b. – Vol. 328. – P.181-186.
6. Чарыков А.К. Математическая обработка результатов химического анализа. – Л.: Химия, 1984. – 168 с.
7. Караваева О.А. Детекция бактерий рода *Azospirillum* с помощью бактериофагов, выделенных из *Azospirillum brasilense* штаммов Sp7 и SR75// Дис. ... кандидата биол. наук. – Саратов. – 2012. – 173 с.
8. Bunin V.D., Ignatov O.V., Guliy O.I., Voloshin A.G., Dykman L.A., O’Neil D., Ivnitiski D. Studies of *Listeria monocytogenes*-antibody binding using electro-orientation // *Biosens. Bioelectron.* – 2004a. – Vol. 19, Is. 2. – P. 1759-1761.
9. Гулий О.И., Маркина Л. Н., Игнатов О.В., Щеголев С. Ю., Зайцева И. С., Бунин В.Д., Игнатов В.В. Влияние ампициллина на электрофизические свойства клеток *Escherichia coli* // *Микробиология*. – 2005. – Т.74, №1. – С. 126-131.
- 10 Гулий О. И., Маркина Л. Н., Бунин В. Д., Игнатов В.В., Игнатов О. В. Исследование электрооптических параметров суспензий клеток *Escherichia coli* при действии канамицина // *Микробиология*. – 2008. – Т. 77, №3. – С. 380-385.

**DETECTION OF BACTERIA AZOSPIRILLUM BY BACTERIOPHAGES ISOLATED FROM AZOSPIRILLUM BRASILENSE STRAINS SP7 AND SR75**

*Guliy O.I., Karavaeva O.A., Makarihina S.S., Pavliy S.A., Ignatov O.V.*

**Key words:** *Azospirillum brasilense, bacteriophage, detection*

*Paper investigates the possibility of using phages isolated from soil microorganisms Azospirillum brasilense strains Sp7 and SR75, for the detection of Azospirillum cells using the electro-optic (EO) analysis of microbial suspensions. In research by the authors determined the minimum detection limit of the cells, which is 10<sup>4</sup> cells / ml. The possibility of using the method of electro-optical analysis for the detection of microbial suspensions azospirill cells through their interaction with specific bacteriophages in the presence of extraneous microflora.*