

7. Федорова Е.В. Разведение потамотригонид в аквакультуре / Федорова Е.В., Романова Е.М., Голенева О.М., Шленкина Т.М. // Международный научно-исследовательский журнал ISSN 2303-9868. – Екатеринбург, №2 (21) 2014 Часть1. – С 67-68.

## THE INFLUENCE OF MONOGENETIC FLUKES ON THE DEVELOPMENT OF CARP IN THE PONDS OF THE ULYANOVSK REGION

Goleneva O.M., Romanova E. M., Lyubomirova V. N.

**Key words:** fish, monogenetic flukes, dactylogyus carp, the outbreak of fish nursery ponds.  
The work is devoted to determining the effects of parasitic infestations caused by monogenetic flukes of the genus Dactylogyus on fish pond farms and the establishment of the causes.

УДК 579.6

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ЭЛЕКТРООПТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ БАКТЕРИОФАГОВ

О.И. Гулий<sup>1;2;3</sup>, С.С.Макарихина<sup>4</sup>, В.Д. Бунин<sup>5</sup>, С.А. Староверов<sup>1;2;3</sup>, О.В. Игнатов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> - ФГБУН Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, Саратов

<sup>2</sup> - ФГБОУ ВПО Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И.Вавилова, Саратов

<sup>3</sup> - Саратовский научно-исследовательский ветеринарный институт Российской академии сельскохозяйственных наук, Саратов

<sup>4</sup> - Лицей-интернат естественных наук» (ЧОУ «ЛИЕН»), Саратов

<sup>5</sup> - Elosystems GbR, Берлин, Германия

**Ключевые слова:** детекция, бактериофаги, микробные клетки, электрооптический метод анализа

Изучены изменения электрооптических параметров (ЭО) суспензии клеток при взаимодействии с бактериофагами. На примере бактериофага ΦAI-Sp59b показана возможность детекции вирусных частиц методом ЭО анализа, предел детекции бактериофагов составляет  $10^6$  фаговых частиц/мл при времени анализа 1-5 мин. Полученные результаты могут быть использованы для создания экспресс-метода детекции бактериофагов.

В связи с широким распространением и использованием бактериофагов задачи определения вирусных частиц привлекают все большее внимание, имеющие как научное, так и практическое значение. Для определения вирусов разработано огромное количество микробиологических, биохимических, молекулярно-биологических, иммунологических, физических методов [1]. По объекту исследования используемые подходы выявления бактериофагов можно разделить на:

1) методы детекции непосредственно вирусных частиц и определения вирусной инфекционности;

2) методы детекции компонентов вирионов (нуклеиновой кислоты);

3) методы определения вирусных антигенов [2].

Несмотря на значительное число разработанных методов детекции вирусных частиц, их практическое использование затруднено из-за сложности процедуры анализа и малого

числа существующих измерительных приборов. Поэтому актуальной задачей остается разработка новых методов детекции вирусов бактерий в различных образцах, позволяющих получать результат за короткое время.

В последнее время методы электрооптического (ЭО) анализа все чаще находят применение для решения ряда задач в микробиологии и биотехнологии. Методы ЭО анализа микробных суспензий основаны на регистрации изменения оптических свойств суспензии под влиянием переменного электрического поля. Исследование основано на измерении зарядов, индуцированных электрическим полем, на границе клеточных структур. После взаимодействия зарядов на этой границе с электрическим полем меняется ориентация бактерий в окружающей среде, что приводит к изменению оптических свойств суспензии [3].

Целью работы являлось исследование возможности использования метода ЭО анализа для детекции бактериофагов на примере микробных клеток *Azospirillum lipoferum* Sp59b и бактериофага ФАI-Sp59b.

#### **Материалы и методы исследования.**

*Бактериальные штаммы и условия выращивания бактерий.* В работе использовали микробные клетки *Azospirillum lipoferum* Sp59b и *A. brasilense* штаммы Cd, Jm6B2, *A. irakense* KBC1, полученные из коллекции культур ИБФРМ РАН. Для культивирования бактерий использовали жидкую питательную среду LB следующего состава (г/л): NaCl – 10.0; пептон - 5.0 («Becton, Dickinson and Company», Франция), дрожжевой экстракт («DIFCO», США) – 5.0.

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

*Выделение и характеристика бактериофагов.* Выделение бактериофага проводили с использованием методики, описанной ранее в работе [4].

*Определение количества фаговых частиц.* Количество фаговых частиц определяли спектрофотометрически на приборе Specord BS-250 (Analytik Jena, Германия) в кювете 1 мм.

*Подготовка клеток к электрооптическому анализу.* Для электрооптического анализа клетки трехкратно промывали дистиллированной водой с последующим центрифугированием при 2800 г в течение 5 мин, а затем ресуспендировали в небольшом объеме воды (электропроводность  $1.6 \mu\text{S}/\text{cm}$ ) и центрифугировали при 110 г в течение 1 мин для удаления конгломе-

ратов, как описано [5]. Полученную бактериальную суспензию клеток в надосадочной жидкости разбавляли дистиллированной водой до значительной оптической плотности при 670 нм, равным 0.4, что соответствовало концентрации  $4.5 \times 10^8$  клеток/мл.

*Проведение электрооптического анализа клеточных суспензий.* Измерение ориентационных спектров (ОС) клеток проводили на электрооптическом анализаторе ELOAnalyser (производства EloSystem GbR, Berlin, Germany) с дискретным набором частот ориентирующего электрического поля 20; 40; 100; 200; 400; 900; 1400 и 2100 кГц при 670 нм, напряженности электрического поля 17 В/см, времени его приложения 16 с. Длина оптического пути электрооптической ячейки составляла 8 мм, объем - 1 мл, концентрация клеток -  $4.5 \times 10^8$  клеток/мл. Количество клеток определяли стандартным методом с использованием светового микроскопа (Ergaval, Carl Zeiss, Jena, Германия).

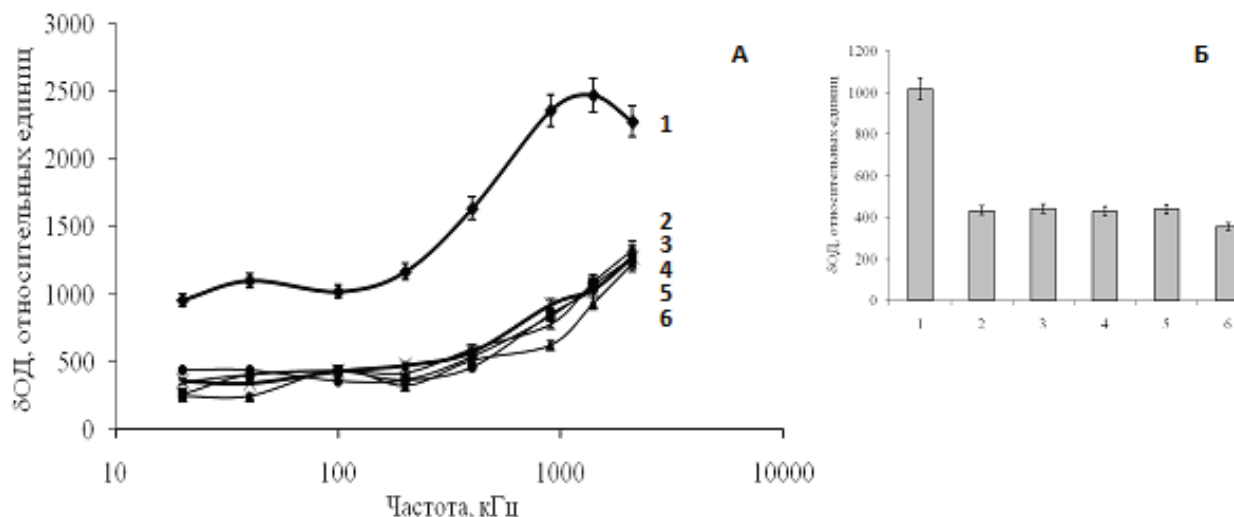
Все анализы проводились, по крайней мере, в пяти повторностях, и результаты представлены в виде средних значений, полученных с указанием стандартного отклонения. Относительная погрешность результатов измерений стандартных образцов составляла  $\pm 3\%$ .

**Результаты и их обсуждение.** За счет рецепторов, расположенных на поверхности клетки осуществляется узнавание и прикрепление бактериофагов только к специфичным бактериальным клеткам. Мы предложили использовать этот принцип для детекции бактериофагов при помощи метода ЭО анализа микробных суспензий. В результате адсорбции бактериофага на микробной клетке происходит перераспределение белков клеточной поверхности, что приводит к изменениям ЭО параметров микробных суспензий [6]. Таким образом, регистрируя изменения ЭО параметров клеточной суспензии при взаимодействии со специфическим бактериофагом возможно идентифицировать присутствие бактериофага в исследуемом образце.

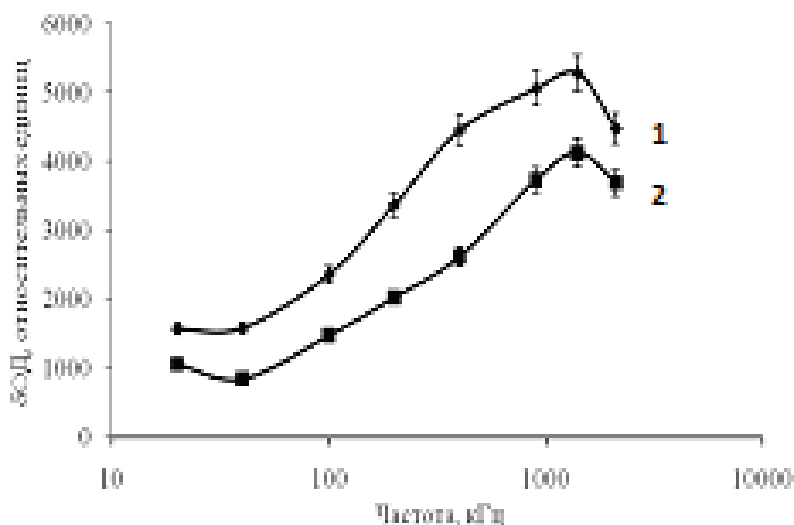
В качестве модельных объектов использовали бактериофаги ФАI-Sp59b, выделенные из клеток *A. lipoferum* штамма Sp59b. Основные свойства бактериофага описаны в работе [4].

Предварительно проводилась оптимизация условий измерений ЭО параметров клеточных суспензий *A. lipoferum* штамма Sp59b, по напряженности, частоте, времени приложения электрического поля.

Далее исследовали изменения величины ЭО параметров клеточной суспензии *A. lipoferum*



**Рисунок 1 - (А) Динамика изменения величины ЭО-сигнала суспензии клеток *A. lipoferum Sp59b* при их инфицировании бактериофагом ФАI-Sp59b: (1) – контроль – клетки без добавления бактериофага; клетки с добавлением бактериофага: мин от начала инфекции: (2) – 5, (3) – 10, (4) – 20, (5) – 30, (6) – 40.**  
**(Б) Изменение значений относительных величин при частоте ориентирующего поля 100 кГц.**



**Рисунок 2 - (А) Изменение величины ЭО-сигнала смешанной суспензии клеток *A. lipoferum Sp59b*, *A. brasilense Cd*, *Jm6B2* и *A. irakense KBC1* при их инфекции бактериофагом ФАI-Sp59b: (1) – контроль – клетки без добавления бактериофага; (2) - клетки с добавлением бактериофага**

штамма Sp59b при взаимодействии с бактериофагом ФАI-Sp59b в зависимости от количества фагов, внесенных в суспензию из расчета на 1 бактерию. Для этого в суспензию клеток, подготовленных для ЭО анализа, вносили разное количество специфического бактериофага ФАI-Sp59b из расчета 5, 10, 15, 20, 25, 30 фаговых частиц на

клетку. Затем суспензии клеток с бактериофагами инкубировали при 37°C в течение 5 мин, после чего подготавливалась и использовалась для ЭО измерений. В качестве контроля использовали клетки *A. lipoferum Sp59b* без добавления бактериофага. Было установлено, что в исследуемом диапазоне частот регистрируются значительные

изменения величины ЭО сигнала суспензии клеток после взаимодействия с бактериофагом ФАI-Sp59b, при этом максимальное изменение величины ЭО сигнала происходит при внесении бактериофага из расчета 5 фаговых частиц на клетку.

В последующих экспериментах для регистрации инфицирования клеток в суспензию вносили 10 фагов на 1 бактерию. Установлено, что минимальный титр бактериофага ФАI-Sp59b, регистрируемый в образце, с помощью микробных клеток *A. lipoferum* Sp59b, составляет  $10^6$  фаговых частиц в 1 мл.

Далее изучали динамику изменений ЭО параметров суспензии клеток *A. lipoferum* Sp59b при их инфицировании бактериофагом ФАI-Sp59b. Для этого в суспензию вносили бактериофаг ФАI-Sp59b, затем бактериальная суспензия инкубировалась в течение 1, 5, 10, 20, 30, 40 и 60 мин, подготавливалась и использовалась для ЭО анализа. Показано, что изменения величины ЭО сигнала происходит уже через 1 мин после добавления бактериофага ФАI-Sp59b к суспензии клеток *A. lipoferum* Sp59b (рис. 1 (А)), и незначительно изменялось при дальнейшем воздействии бактериофага. Изменения величины ЭО сигнала суспензии клеток после 5, 10, 20, 30, 40 и 60 мин от начала инфекции клеток бактериофагом фиксировались в пределах 5%. Для удобства представления данных была использована величина ЭО сигнала при частоте ориентирующего поля 100 кГц (рис. 1 (Б)).

Таким образом, можно заключить, что оптимальное время для проведения ЭО анализа регистрации наличия исследуемого бактериофага составляет в среднем 1-5 мин.

На следующем этапе исследований изучалась возможность детекции изучаемого бактериофага в присутствии микробных клеток других микроорганизмов. В качестве балластных культур использовали клетки *A. brasilense* штаммов Cd, Jm6B2, а также *A. irakense* штаммов KBC1. Выбор данных культур обусловлен тем, что бактериофаг ФАI-Sp59b не проявляет активность в отношении них [4]. Для этого к смешанной суспензии клеток *A. lipoferum* штамма Sp59b, *A. brasilense* штаммов Cd, Jm6B2 и *A. irakense* KBC1 (в соотношении

1:1:1:1) добавляли бактериофаг ФАI-Sp59b из расчета 10 фаговых частиц на клетку и регистрировали изменение величины ЭО сигнала. Условия проведения эксперимента были аналогичны вышеизложенным. В качестве контроля использовалась смешанная суспензия клеток *A. lipoferum* Sp59b, *A. brasilense* штаммов Cd, Jm6B2 и *A. irakense* KBC1 без добавления бактериофага (рис. 2).

Из представленных данных видно, что при добавлении бактериофагов к суспензии клеток *A. lipoferum* Sp59b в присутствии мешающих факторов (клеток других видов микроорганизмов) происходит изменение величины электрооптического сигнала.

Дополнительно были проведены контрольные эксперименты по изучению неспецифического взаимодействия бактериофага ФАI-Sp59b с клетками *A. brasilense* штаммов Cd, Jm6B2 и *A. irakense* KBC1. Было показано, ОС клеток *A. brasilense* штаммов Cd, Jm6B2 и *A. irakense* KBC1 после их инфицирования исследуемым бактериофагом не изменяются, т.е., бактериофаг ФАI-Sp59b не инфицирует клетки данных штаммов.

Таким образом, в результате проведенных исследований показано, что ЭО анализатор позволяет четко разграничивать ситуации, когда происходит взаимодействие бактериальных клеток *A. lipoferum* Sp59b со специфическим бактериофагом ФАI-Sp59b от контрольных экспериментов, когда такое взаимодействие отсутствует, при этом предел детекции бактериофагов  $10^6$  фаговых частиц/мл. Определено оптимальное время для проведения ЭО анализа регистрации исследуемого бактериофага, которое составляет в среднем 1-5 мин. Показана возможность детекции бактериофагов на примере бактериофага ФАI-Sp59b и микробных клеток *A. lipoferum* Sp59b при помощи метода ЭО анализа в присутствии в присутствии таких мешающих факторов, как посторонние бактерии.

Данные результаты в последующем могут быть использованы для создания экспресс метода индикации вирусов в объектах окружающей среды с целью проведения санитарной экспертизы.

#### **Библиографический список:**

1. Yousef A.E., Detection of bacterial pathogens in different matrices: current practices and challenges, in: Zourob, M., Elwary, S., Turner, A.P.F. (Eds.), Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems. Springer, New York, 2008, 31-48.
2. Virology: principles and applications / Ed. J. Carter, V. Saunders, London: J. Wiley & Sons Ltd, 2007. P.358.
3. Shchyogolev, S.Y., Khlebtsov, N.G., Bunin, V.D., Sirota, A.I. and Bogatyrev, V.A. Inverse problems of spectroturbidimetry of biological disperse systems with random and ordered particle orientation / Quantifi-

cation and localization using diffused photon in a highly scattering media / Ed. by B. Chance et al., Proc. SPIE. V. 2082. - Bellingham, Washington: SPIE, 1994. P. 167-176.

4. Макарихина С.С., Гулий О.И., Соколов О.И., Буров А.М., Павлий С.А., Сивко О.Н., Володин Д.Ю., Игнатов О.В. Выделение и характеристика бактериофага *Azospirillum lipoferum* штамма SP 59B // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. Саратов, 2013, Том 13, Выпуск 2. С. 56-61.
5. Guliy O.I., Matora L.Yu., Dykman L.A., Staroverov S.A., Burygin G.L., Bunin V.D., Burov A.M., Ignatov O.V. Electro-optical study of the exposure of *Azospirillum brasilense* carbohydrate epitopes. J Immunoassay Immunochem. V. 36. 2015. P. 379-386.
6. Bunin V.D., Ignatov O.V., Guliy O.I. Zaitseva I.S. Dykman L.A., O'Neil D., Ivnitski D. Electro-optical analysis of the *Escherichia coli*-phage interaction. // Anal. Biochem. 2004. V. 328. P.181-186.

## USING ELECTROOPTICAL ANALYSIS FOR DETECTION BACTERIOPHAGES

O.I. Guly, S.S.Makarikhina, V.D. Bunin, S.A. Staroverov, O.V. Ignatov

**Keywords:** detection, bacteriophages, microbial cells electrooptical analysis method

*The changes of the parameters of the electro-optic (EO) of the cell suspension in the interaction with bacteriophages. For example, the bacteriophage ΦAI-Sp59b the possibility of detection of viral particles by the EA analysis, the detection limit is 10<sup>6</sup> bacteriophage phage particles / ml at analysis time of 1-5 minutes. The results can be used to create a rapid method for detecting bacteriophages.*

УДК 639.311

## СОВРЕМЕННЫЕ СПОСОБЫ ПРОФИЛАКТИКИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ПРУДОВЫХ РЫБ

В.В. Зотов, аспирант

ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет пищевых производств»,  
8 (926) 548-97-00, valeriyzotov@mail.ru

**Ключевые слова:** аэромонад, псевдомонад, динамика численности, прудовое рыбоводство, рыбопродуктивность, сапрофитные бактерии, эвтрофикация.

*В работе показаны перспективы увеличения выхода рыбной продукции в прудовом рыбоводстве страны, прочно связанные с интенсификацией рыбоводной технологии. Интенсификация рыбоводства в таких водоемах неизбежно сопряжена с эвтрофикацией.*

**Введение.** Увеличение загрязненности рыбоводных прудов органическими отходами сопровождается ростом бактериальной деструкции. Четким признаком загрязненности водоема является численность в воде сапрофитных бактерий. Наиболее распространенными в воде сапрофитными бактериями – возбудителями болезней рыб, являются бактерии рода *Aeromonas* почвенные сапрофиты *Pseudomonas*[2, 5].

С каждым годом в рыбоводстве РФ все большее значение приобретает товарное выращивание карпа, белого и пестрого толстолобиков. У этих рыб все чаще стали отмечать вспышки заболеваний аэромонадной этиологии. Они протекают, как правило, параллельно с краснухоподобными заболеваниями карпа. В холодное время года в рыбоводных прудах наиболее часты вспышки псевдомонады толстолобиков. Аэромонады пре-