

Оригинальная статья / Original Paper

DOI 10.15826/urej.2020.4.1.001

УДК 534.2

Оценка жизнеспособности бактериальных клеток при их взаимодействии с бактериофагами с помощью акустического датчика

И. А. Бородина¹ ✉, Б. Д. Зайцев¹, О. И. Гулий^{2,3}

¹ Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН,
Саратовский филиал, Россия, 410019, г. Саратов, ул. Зеленая, 38

² Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН,
Россия, г. Саратов, 410049, ул. Проспект энтузиастов, 13

³ Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова,
Россия, 410012, г. Саратов, Театральная площадь, 1

✉ e-mail: borodinaia@yandex.ru

Аннотация

В статье представлен датчик на основе щелевой моды в акустической линии задержки для экспресс-анализа и оценки жизнеспособности бактериальных клеток непосредственно в жидкой проводящей суспензии. В качестве аналитического сигнала использовали изменение глубины и частоты пиков резонансного поглощения на частотной зависимости полных потерь выходного сигнала датчика до и после биологического взаимодействия бактериальных клеток с бактериофагами. Измерения проводились в суспензиях с начальной проводимостью 5–30 мкСм/см. Для подавления биохимических процессов в бактериальных клетках с целью оценки их жизнеспособности клеточную суспензию подвергали температурному воздействию в температурном интервале 60–100 °С с последующим охлаждением. Конструкция датчика позволяла многократно использовать съемный контейнер, при этом значительно упростился процесс его очистки от отработанного образца.

Ключевые слова

акустическая линия задержки, щелевая мода, пики резонансного поглощения, жизнеспособность бактериальных клеток, бактериофаги

Для цитирования

Бородина И. А., Зайцев Б. Д., Гулий О. И. Оценка жизнеспособности бактериальных клеток при их взаимодействии с бактериофагами с помощью акустического датчика. *Ural Radio Engineering Journal*. 2020;4(1):7–17. DOI: 10.15826/urej.2020.4.1.001

Assessment of the viability of bacterial cells in their interaction with bacteriophages using an acoustic sensor

I. A. Borodina¹ ✉, B. D. Zaitsev¹, O. I. Guliy^{2,3}

¹ Kotel'nikov Institute of Radio Engineering and Electronics, RAS, Saratov Branch, 38 Zelyonaya Str., Saratov, 410019, Russia

² Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, RAS, 13 Prospekt Entuziastov, Saratov 410049, Russia

³ Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov, 1 Theater Square, Saratov, 410012, Russia.

✉ e-mail: borodinaia@yandex.ru

Abstract

The article presents a slot-mode sensor in acoustic delay line for rapid analysis and assessment of the viability of bacterial cells directly in a liquid conductive suspension. The main element of the sensor is the delay line made of the Y-X lithium niobate plate. Two interdigital transducers (IDTs) were applied to the surface of the plate to excite and receive the acoustic SH_0 wave. A liquid container was placed above the waveguide of the delay line between the IDTs with the given gap of 8 μm . The bottom of the container was made of the Z-X + 30° lithium niobate plate. The sensor was connected to the S-parameter meter E5071C (Agilent, USA), and the frequency dependence of the insertion loss of the sensor output signal was measured. During the measurements the presence of pronounced resonance peaks in the frequency dependence of the insertion loss of the sensor associated with the excitation of the slot mode was observed. The method of the analysis of the microbial cells was based on recording changes in the depth and frequency of resonance absorption peaks on the frequency dependence of the insertion loss of the sensor before and after the biological interaction of the microbial cells with the specific bacteriophages. The sensor recorded the infection of microbial cells with the specific bacteriophages in suspensions with the initial conductivity of 4.5–30 $\mu\text{S}/\text{cm}$. The analysis time was 5–10 minutes, the limit of the determination of the microbial cells was 10^8 cells/ml. The control experiments were conducted with the nonspecific interactions of the microbial cells with the bacteriophages, in which no change in the sensor parameters was observed. To suppress the biochemical processes in the cells or the further assessment of their viability, the cell suspension was heated to 60, 80, and 100 °C. Then the cell suspension was cooled to the room temperature, placed in the liquid container and the sensor readings were recorded. After that, the specific bacteriophage was added and the sensor readings were again recorded. A distinctive feature of the used sensor is the lack of contact of the suspension under investigation with the thin (200 μm) waveguide of the delay line. Therefore, the additional advantage of the sensor is the presence of a removable container with the liquid, which allows to reuse it and to facilitate the process of cleaning the container from the spent sample. This fact is an important condition when working with microorganisms.

Keywords

acoustic delay line, slot mode, peaks of the resonant attenuation, viability of bacterial cells, bacteriophages

For citation

Borodina I. A., Zaitsev B. D., Guliy O. I. Assessment of the viability of bacterial cells in their interaction with bacteriophages using an acoustic sensor. *Ural Radio Engineering Journal*. 2020;4(1):7–17. DOI: 10.15826/urej.2020.4.1.001

Введение

Исследования микробного загрязнения воды, продуктов питания и предметов домашнего обихода важны для своевременной профилактики пищевых отравлений и массовых заболеваний. В целях осуществления постоянного санитарно-бактериологического контроля поверхности объектов, находящихся в медицинских лабораториях и используемых в пищевой промышленности, применяются различные микробиологические методы для определения бактериальной обсемененности. Отбор проб для санитарно-микробиологического исследования предметов обихода и оборудования обычно осуществляется путем использования смывов (тампонами или салфетками); отпечатков (контактный метод); агаровой заливки. В дальнейшем для получения результата о наличии/отсутствии обсемененности требуется не менее 24 часов. Поэтому развитие быстрых методов оценки обсемененности предметов является весьма актуальным для медицины, ветеринарии и пищевой промышленности.

В этом плане биосенсорные системы являются уникальным решением для определения микробных клеток. Тем не менее, большинство сенсорных устройств, разработанных к настоящему времени, не адаптированы к проведению измерений в реальных образцах с высокой проводимостью (например, в воде, используемой в промышленных или муниципальных объектах) [1]. Кроме того, в большинстве статей, описывающих биосенсоры, практически отсутствуют данные об условиях очистки сенсоров от анализируемого образца, особенно при определении микробных клеток [2–4]. Еще одним актуальным вопросом является оценки жизнеспособности бактериальных клеток в анализируемом образце, поскольку наибольшую опасность представляют именно жизнеспособные бактериальные клетки.

Ранее нами было показано, что в результате инфекции микробных клеток специфичными бактериофагами происходит изменение электрофизических параметров измеряемой суспензии (в частности, проводимости), которое фиксируются акустическими датчиками на основе пьезоэлектрического резонатора

с поперечным электрическим полем или пьезоэлектрической пластины с распространяющейся пьезоактивной волной [5; 6]. Поскольку бактериофаги инфицируют только метаболически активные микробные клетки, оценка изменений параметров датчика при регистрации инфекции микробных клеток бактериофагом может служить информативным параметром жизнеспособности бактерий.

В настоящей работе показана возможность экспресс-анализа и оценки жизнеспособности бактериальных клеток при их инфекции бактериофагами в растворах с различной проводимостью с помощью акустического датчика на основе щелевой моды в акустической линии задержки.

1. Описание датчика и методики измерений

Основным элементом датчика для анализа бактериальных клеток и оценки их жизнеспособности служила линия задержки на основе пьезоэлектрической пластины Y-X ниобата лития толщиной 200 мкм (рис. 1). На поверхности пластины были нанесены два встречно-штыревых преобразователя (ВШП) для возбуждения и приема акустической волны с поперечно-горизонтальной поляризацией нулевого порядка (SH_0). Над звукопроводом линии задержки между ВШП с зазором 8 мкм помещалась жидкостная ячейка объемом 2 мл. Дно ячейки было изготовлено из пластины Z-X+30° ниобата лития толщиной 500 мкм [7].

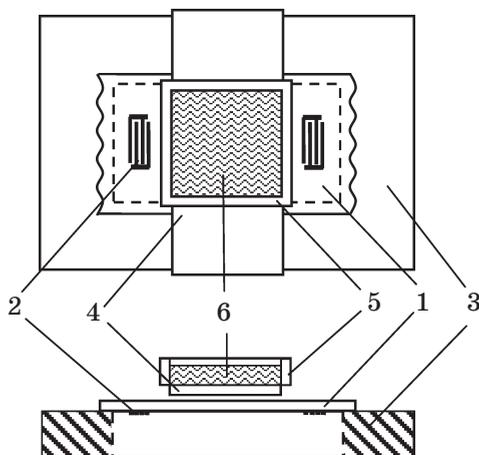


Рис. 1. Схема исследуемой линии задержки:

- 1 – пьезоэлектрическая пластина Y-X LiNbO_3 ; 2 – ВШП; 3 – держатель из оргстекла; 4 – пьезоэлектрическая пластина Z-X +30° LiNbO_3 ;
5 – жидкостный контейнер; 6 – исследуемая суспензия

Fig. 1. The scheme of the sensor:

- 1 – lithium niobate plate of Y-X cut; 2 – IDTs; 3 – holder of the plexiglass;
4 – lithium niobate plate of Z-X+30° cut; 5 – liquid container;
6 – suspension of the cells under study

При помощи разработанного датчика экспериментально исследовалось биологическое взаимодействие «бактериальные клетки – бактериофаги» непосредственно в жидкой фазе.

Для этого датчик подключался к измерителю S-параметров E5071C («Agilent», США) в режиме измерения полных потерь выходного сигнала устройства. Первоначально измерялись характеристики датчика с ячейкой без жидкости и было установлено наличие ярко выраженных резонансных пиков на частотной зависимости полных потерь, связанных с возбуждением целевой моды (рис. 2, I) [7]. Резонансные пики возникают из-за многократных переотражений акустической волны в пластине $Z\text{-X } +30^\circ \text{ LiNbO}_3$. Каждый резонансный пик соответствует случаю, когда по ширине этой пластины укладывается целое количество акустических полуволн.

Затем жидкостный контейнер заполнялся буферным раствором с определенной проводимостью и измерялись частотные зависимости полных потерь датчика для ячейки с буферным раствором.

Далее измерительную ячейку очищали, просушивали и добавляли в нее буферный раствор с микробными клетками и измерялись параметры датчика для этого случая. На последнем этапе в жидкостную ячейку добавлялись бактериофаги и проводилось измерение частотной зависимости полных потерь выходного сигнала датчика для суспензии клеток с добавленным бактериофагом. По измеренным зависимостям определялись частота и глубина резонансных пиков.

Для определения наличия живых клеток в суспензии ее прогревали в течение 10 минут при 60, 80 и 100 °С. Затем клеточную суспензию охлаждали до температуры 21 °С, помещали в жидкостный контейнер и считывали показания датчика. После этого добавляли специфичный бактериофаг и снова записывали показания датчика.

2. Полученные результаты и их обсуждение

В качестве модельной системы использовали микробные клетки кишечной палочки *E. coli* XL-1 и специфичный им бактериофаг M13K07. В качестве проводящей жидкости использовали фосфатно-буферный солевой раствор с различной электропроводностью (5, 10, 15, 20, 25 и 30 мкСм/см). Электропроводность определяли с помощью кондуктометра HANNA HI 8733 (Hanna Instruments, Inc., США).

Добавление буферного раствора в ячейку приводило к значительному уменьшению глубины резонансных пиков по сравнению с пустой ячейкой (рис. 2, II). Дальнейшее добавление к буферному раствору микробных клеток практически не вли-

яло на характеристики датчика (рис. 2, *III*), однако последующее добавление к буферному раствору с клетками *E. coli* XL-1 специфического бактериофага М13К07 приводило к существенному уменьшению глубины резонансных пиков (черная кривая на рис. 2, *IV*). Этот результат объясняется тем, что в результате инфекции микробных клеток специфическими бактериофагами происходит увеличение проводимости измеряемой суспензии, которое фиксируется акустическими датчиками [5; 6; 8].

В процессе исследований проводимость буферных растворов менялась от 5 до 30 мкСм/см, концентрация бактериальных клеток составляла 10^8 , 10^6 и 10^4 кл/мл. Диапазон изменения глубины резонансных пиков вследствие специфического биологического взаимодействия «бактериальные клетки *E. coli* XL-1 – бактериофаг М13К07» составил 7–12 дБ.

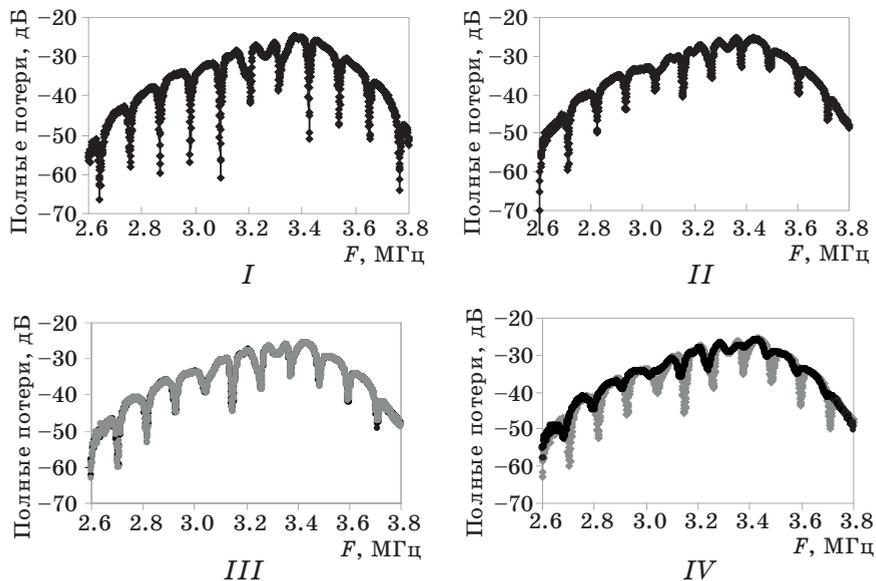


Рис. 2. Частотные зависимости полных потерь датчика с пустой ячейкой (*I*); с буферным раствором (*II*); с буферным раствором и клетками *E. coli* XL-1 (*III*); с буферным раствором и клетками *E. coli* XL-1 (серая кривая) при добавлении специфических бактериофагов М13К07 (черная кривая) (*IV*). Проводимость буферного раствора составляет 30 мкСм/см. Концентрация бактериальных клеток равна 10^6 кл/мл

Fig. 2. The frequency dependences of the insertion losses of the sensor with the empty container (*I*); with the buffer solution (*II*); with the buffer solution and cells (*III*); with the buffer solution and the cells (gray curve) after adding of the specific bacteriophage (black curve) (*IV*). The conductivity of the buffer solution is 30 μ S/cm. The concentration of bacterial cells is 10^6 cells/ml

Также было показано, что разработанный датчик позволяет различать ситуации, когда бактериальные клетки заражаются бактериофагами и когда такая инфекция отсутствует. С этой целью были проведены эксперименты по неспецифическому взаимодействию бактериофага M13K07 и клеток *A. lipoferum* Sp59b. Измерения проводились для тех же значений проводимости буферного раствора, что и в случае специфического взаимодействия. Количество клеток в жидкостном контейнере в данном случае составляло 10^8 кл./мл.

Полученные результаты показали, что добавление к суспензии клеток *A. lipoferum* Sp59b бактериофага M13K07 не приводит к изменениям глубины и частоты резонансных пиков на частотной зависимости полных потерь выходного сигнала датчика при любой проводимости буферного раствора. На рис. 3 представлены частотные зависимости полных потерь датчика с контейнером, заполненным буферным раствором с проводимостью 10 мкСм/см и клетками *A. lipoferum* Sp59b до (черная кривая) и после (серая кривая) добавления неспецифических бактериофагов. Видно, что эти кривые практически полностью совпадают.

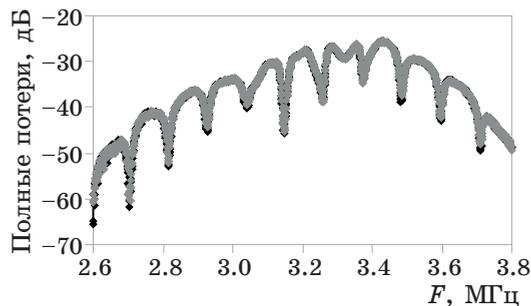


Рис. 3. Частотные зависимости полных потерь датчика с контейнером, заполненным буферным раствором с проводимостью 10 мкСм/см и клетками *A. lipoferum* Sp59b до (черная кривая) и после (серая кривая) добавления неспецифических бактериофагов M13K07. Концентрация клеток равна 10^8 кл./мл

Fig. 3. The frequency dependences of the insertion losses of the sensor with the container filled with the buffer solution with the conductivity of $10 \text{ }\mu\text{S/cm}$ and *A. lipoferum* Sp59b cells before (black curve) and after (gray curve) adding the nonspecific bacteriophage M13K07. The cell concentration is 10^8 cells/ml

Одним из важных вопросов при разработке новых методов обнаружения клеток является определение их жизнеспособности. Поскольку бактериофаги инфицируют только метаболически активные микробные клетки, оценка изменений параметров датчика (глубины и частоты резонансных пиков) при инфекции

микробных клеток бактериофагом может служить информативным параметром жизнеспособности бактерий.

В данном цикле экспериментов использовали клетки *E.coli* XL-1 с концентрацией 10^6 и 10^3 кл/мл; проводимость буферного раствора менялась от 4.5 до 30 мкСм/см.

Ингибирование биохимических процессов в микробных клетках приводит к невозможности процесса деления клеток и, соответственно, их заражения фагом. Для подавления биохимических процессов в клетке суспензию клеток нагревали до 60, 80 и 100 °С.

Были получены частотные зависимости вносимых потерь датчика для всех исследуемых случаев. На основе этих частотных зависимостей были построены зависимости изменения глубины резонансных пиков от температуры нагрева суспензии клеток при различных значениях начальной проводимости буферного раствора. На рис. 4 в качестве примера представлены зависимости изменения глубины резонансного пика на частотной зависимости полных потерь датчика вблизи частоты 2.9 МГц от температуры нагрева суспензии клеток при специфическом взаимодействии «клетки *E. coli* XL-1 – бактериофаг М13К07» для различных значений начальной проводимости буферного раствора.

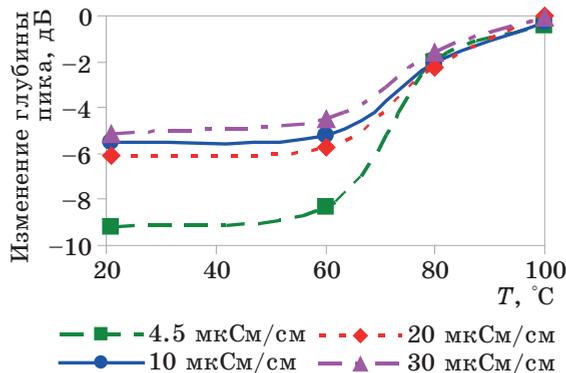


Рис. 4. Зависимости изменения глубины резонансного пика на частотной зависимости полных потерь датчика вблизи частоты 2.9 МГц от температуры нагрева суспензии клеток при специфическом взаимодействии «клетки *E. coli* XL-1 – бактериофаг М13К07». Значения электропроводности буферного раствора при этом равны 4.5, 10, 20 и 30 мкСм/см. Концентрация клеток равна 10^3 кл/мл

Fig. 4. Dependences of changes in the depth of the resonance peak on the frequency dependence of the insertion losses of the sensor near the 2.9 MHz frequency on the heating temperature of the cell suspension during the specific interaction of “*E. coli* XL-1 cells – bacteriophage M13K07”. The electrical conductivity of the buffer solution is 4.5, 10, 20, and 30 $\mu\text{S}/\text{cm}$. The cell concentration is 10^3 cells/ml

Видно, что наибольшее изменение глубины резонансного пика наблюдается при температурах до 60 °С для всех значений проводимости буферного раствора. То есть при нагреве суспензии клеток до 60 °С бактериальные клетки активно взаимодействуют со специфичным бактериофагом, то есть остаются жизнеспособными. При нагреве исследуемой клеточной суспензии до 80 °С изменения глубины резонансных пиков становятся значительно меньше (~2дБ). Это означает, что количество жизнеспособных клеток в суспензии уменьшается. После нагрева суспензии клеток до 100 °С глубина резонансных пиков практически не меняется для всех исследуемых образцов, поскольку в данном случае не происходит взаимодействия микробных клеток со специфичным бактериофагом. Таким образом, можно сделать вывод о том, что нагрев клеточной суспензии до 100 °С приводит к полной гибели бактериальных клеток.

Заключение

Проведенные эксперименты показали возможность бесконтактного определения бактериальных клеток в суспензии с проводимостью до 30 мкСм/см путем регистрации специфического взаимодействия «бактериальные клетки – бактериофаг» с помощью датчика на основе щелевой моды в акустической линии задержки с поперечно-горизонтальной волной нулевого порядка. Установлен предел обнаружения микробных клеток датчиком, который составляет 10^3 кл/мл. Поскольку бактериофаги обладают специфичностью в отношении микробных клеток и инфицируют только жизнеспособные клетки, полученные данные об изменении параметров датчика при специфичном взаимодействии «микробные клетки – бактериофаги» могут служить показателем жизнеспособности микробных клеток.

Преимуществами используемого датчика являются возможность одновременного анализа микробных клеток с оценкой их жизнеспособности; проведение анализа в проводящих растворах; возможность многократного использования и очистки измерительной ячейки от бактериальных клеток без повреждения поверхности датчика.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 19-07-00304а.

Acknowledgments

This research is supported by grant No. 19-07-00304a from the Russian Foundation for basic research.

Список литературы / References

1. Chen S., Cheng Y.F. Biosensors for bacterial detection. *International Journal of Biosensors & Bioelectronics*. 2017;2(6):197–199. DOI: 10.15406/ijbsbe.2017.02.00048
2. O'Mara P., Farrell A., Bones J., Twomey K. Staying alive! Sensors used for monitoring cell health in bioreactors. *Talanta*. 2018;176:130–139. DOI: 10.1016/j.talanta.2017.07.088
3. Jyoung J.Y., Hong S., Lee W., J. Choi W. Immunosensor for the detection of *Vibrio cholerae* O1 using surface plasmon resonance. *Biosens. Bioelectron*. 2006;21(12):2315–2319. DOI: 10.1016/j.bios.2005.10.015
4. Turner A.P.F., Karube I., Wilson G.S. *Biosensors: fundamentals and applications*. Oxford University Press; 1987.
5. Guliy O.I., Zaitsev B.D., Borodina I.A., Shikhabudinov A.M., Teplykh A.A. Analysis of interaction of bacterial cells and bacteriophages in conducting suspensions with an acoustic sensor. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2017;53(4):464–469. DOI: 10.1134/S0003683817040068
6. Guliy O.I., Zaitsev B.D., Borodina I.A., Teplykh A.A., Ignatov O.V. An acoustic method for the analysis of bacterial cells. *Biophysics*. 2016;61(4):629–639. DOI: 10.1134/S0006350916040138
7. Borodina I.A., Zaitsev B.D., Teplykh A.A. The influence of viscous and conducting liquid on the characteristics of the slot acoustic wave. *Ultrasonics*. 2018;82:39–43. DOI: 10.1016/j.ultras.2017.07.011
8. Guliy O.I., Zaitsev B.D., Borodina I.A., Shikhabudinov A.M., Teplykh A.A., Staroverov S.A., Fomin A.S. The biological acoustic sensor to record the interactions of the microbial cells with the phage antibodies in conducting suspensions. *Talanta*. 2018;178:569–576. DOI: 10.1016/j.talanta.2017.09.076

Информация об авторах

Бородина Ирина Анатольевна, кандидат физико-математических наук, ведущий научный сотрудник, Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН (Саратовский филиал), 410019, Саратов, ул. Зеленая, 38; e-mail: borodinaia@yandex.ru.

Зайцев Борис Давыдович, доктор физико-математических наук, профессор, главный научный сотрудник, Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН (Саратовский филиал), 410019, Саратов, ул. Зеленая, 38; e-mail: zai-boris@yandex.ru.

Гулий Ольга Ивановна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, г. Саратов, 410049, ул. Проспект энтузиастов, 13; Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова, Россия, 410012, г. Саратов, Театральная площадь, 1; e-mail: guliy_olga@mail.ru.

Information about the authors

Irina A. Borodina, Candidate of Science in Physics and Mathematics, Leading Scientific Researcher, Kotel'nikov Institute of Radio Engineering and Electronics of RAS (Saratov Branch), 38 Zelyonaya Str., Saratov, 410019, Russia; e-mail: borodinaia@yandex.ru.

Boris D. Zaitsev, Doctor of Science in Physics and Mathematics, Professor, Principal Scientific Researcher, Kotel'nikov Institute of Radio Engineering and Electronics of RAS (Saratov Branch), 38 Zelyonaya Str., Saratov, 410019, Russia; e-mail: zai-boris@yandex.ru.

Olga I. Guliy, Doctor of Biological Sciences, Leading Researcher, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, RAS, 13 Prospekt Entuziastov, Saratov 410049, Russia; Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov, 1 Theater Square, Saratov, 410012, Russia; e-mail: guliy_olga@mail.ru.

Поступила / Received: 27.09.2019

Принята в печать / Accepted: 15.01.2020