



ИММУНОДЕТЕКЦИЯ КЛЕТОК *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* В ПРОВОДЯЩИХ СУСПЕНЗИЯХ АКУСТИЧЕСКИМ ДАТЧИКОМ

^{1,2}Гулий О.И., ³Зайцев Б.Д., ¹Караваяева О.А., ³Бородин И.А.

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН
410049, Саратов, пр. Энтузиастов, 13, e-mail: guliy_olga@mail.ru

²Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова,
410012Саратов, Театральная пл.1

³Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН, Саратовский филиал,
410019, Саратов, ул. Зеленая, д. 38

Резюме

Изучена возможность анализа бактериальных клеток на примере почвенных микроорганизмов *Azospirillum brasilense* штамма Sp7 при их взаимодействии со специфичными антителами с помощью акустического датчика непосредственно в суспензии с различной начальной электрической проводимостью. Датчик представлял собой двухканальную линию задержки на основе пьезоэлектрической пластины ниобата лития, по которой распространялась поперечно-горизонтальная акустическая волна нулевого порядка. Один канал был электрически свободным, а второй канал - электрически закороченным. Жидкостная ячейка располагалась на пластине таким образом, что суспензия контактировала с поверхностью пластины и охватывала оба канала. Анализ проводился путем измерения временной зависимости фазы и полных потерь выходного сигнала датчика на фиксированной частоте до и после биологического взаимодействия микробные клетки – специфичные антитела. Проводимость буферного раствора менялась от 2.2 до 10 мкСм/см, а минимальная определяемая концентрация микробных клеток составила $\sim 10^4$ кл/мл.

Ключевые слова: *Azospirillum brasilense*, акустический датчик, азотфиксация, экологическая микробиология

Цитирование: Гулий О.И., Зайцев Б.Д., Караваяева О.А., Бородин И.А. Иммунодетекция клеток *Azospirillum brasilense* в проводящих суспензиях акустическим датчиком. *Биомика*. 2018. Т.10(2). С.181-186. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-25

IMMUNODETECTION OF THE *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* CELLS IN THE CONDUCTING SUSPENSIONS BY ACOUSTIC SENSOR

^{1,2}Guliy O.I., ³Zaitsev B.D., ¹Karavaeva O.A., ³Borodina I.A.

¹Institute of Biochemistry & Physiology of Plants & Microorganisms, RAS,
13 Prospect Entuziastov, Saratov 410049, Russia, e-mail: guliy_olga@mail.ru

²Saratov State Vavilov Agrarian University, Teatralnay place, Saratov 410012, Russia

³Kotel'nikov Institute of Radio Engineering and Electronics of RAS, Saratov Branch,
38 Zelyonaya str. 410019, Saratov, Russia

Resume

The possibility of the analysis of the bacterial cells by the example of *Azospirillum brasilense* soil microorganisms of the strain Sp7 due to their infection by the specific antibodies was studied by using an acoustic sensor directly in a suspension with the different initial electrical conductivity. The sensor represented a two-channel delay line based on a piezoelectric lithium niobate plate with propagating the

shear-horizontal acoustic wave of zero order. One channel of delay line was electrically free, and the second one was electrically shorted. The liquid container was placed on the plate in such a way that the suspension was in contact with the surface of the plate and covered both channels. The analysis was carried out by measuring the time dependence of the phase and insertion loss of the sensor output signal at a fixed frequency before and after the biological interaction of the microbial cells with specific antibodies. The conductivity of the buffer solution was changed from 2.2 to 10 $\mu\text{S}/\text{cm}$, and the minimum detectable concentration of the microbial cells was equal to $\sim 10^4$ cells/ml.

Keywords: *Azospirillum brasilense*, acoustic sensor, nitrogen fixation, ecological microbiology

Citation: Guliy O.I., Zaitsev B.D., Karavaeva O.A., Borodina I.A. Immunodetection of the *Azospirillum brasilense* cells in the conducting suspensions by acoustic sensor. *Biomics*. 2018. V.10(2). P. 181-186. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-25 [In Russian]

Введение

Важную роль в процессах азотфиксации играют граммотрицательные рост-стимулирующие бактерии рода *Azospirillum*. Среди азоспирилл наибольшее внимание исследователей привлекает вид *Azospirillum brasilense* как модельный объект при изучении ассоциативных и эндофитных ризосимбиозов, образуемых бактериями и высшими растениями. Состав и численность ассоциативной микрофлоры зависит от сезонных колебаний и антропогенных воздействий. Поэтому разработка методов, в том числе методов детекции клеток азоспирилл, позволяющих осуществлять мониторинг состава ризосферных бактерий, является одной из актуальных задач современной экологической микробиологии.

Особенность антител (Ат) образовывать специфичные соединения с соответствующими антигенами используется для определения микробных клеток. Исследование взаимодействия антиген-антитело широко применяется в сенсорных системах для детектирования различных видов микроорганизмов. В последнее время активно развиваются исследования по определению микробных клеток с использованием методов электроакустического анализа.

Принцип действия электроакустических методов анализа основан на регистрации биологических взаимодействий непосредственно в жидкой суспензии, контактирующей с поверхностью пьезоэлектрика. Существует два типа акустических биологических датчиков, для анализа бактерий непосредственно в суспензии без использования иммобилизованных микроорганизмов. Первый тип основан на использовании пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем. При добавлении соответствующих реагентов (антитела, бактериофаги и фаговые антитела) происходит изменение проводимости суспензии клеток, что приводит к соответствующему изменению регистрируемых характеристик резонатора [Pinkham

et al., 2005; Wark et al., 2007; Maurer, Gujer, 1995; Zaitsev et al., 2012; Гулий и др. (Guliy et al.), 2012; 2016]. Второй тип биологических акустических датчиков основан на использовании акустической волны, распространяющейся вдоль пьезоэлектрической пластины. Добавление вышеупомянутых специфичных реагентов в суспензию клеток, приводящее к изменению ее проводимости, изменяет полные потери и фазу выходного сигнала такого датчика [Borodina et al., 2015].

Важным обстоятельством является определение микробных клеток в реальных образцах с различной электрической проводимостью. Электрическая проводимость определяется неорганическими ионами калия, натрия, хлора, карбонатов, фосфатов, а также ионами органических кислот, белков и других органических соединений. Высокая проводимость среды значительно затрудняет возможность определения клеток при их взаимодействии с антителами. Ранее нами была показана возможность определения микробных клеток при их взаимодействии с антителами акустическим датчиком, при этом проводимость среды измерения не превышала 2 мкСм/см [Гулий и др. (Guliy et al.), 2015; Borodina et al., 2015].

Целью данной работы являлось исследование возможности определения микробных клеток на примере почвенных микроорганизмов *Azospirillum brasilense* штамма Sp7 при их взаимодействии со специфичными антителами в растворах с различной электрической проводимостью при помощи акустического датчика, основанного на использовании акустической волны, распространяющейся вдоль пьезоэлектрической пластины.

Материалы и методы исследования

Микробные клетки

В работе использовали *Azospirillum brasilense* штамм Sp7 (IBPPM 150) и *Escherichia coli* XL-1,

полученные из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН.

Культивирование микроорганизмов

Для культивирования бактерий использовали жидкую питательную среду LB следующего состава (г/л): NaCl (Becton Dickinson & Co, США) – 5.0; пептон (Becton Dickinson & Co, США) – 10.0; дрожжевой экстракт (Difco, США) – 5.0. Твердая среда LB содержала 3% агар-агара.

Культуры бактерий выращивали в 250 мл колбах Эрленмейера на жидкой среде LB. Клетки инкубировали на круговой качалке при интенсивности перемешивания 160 об/мин в течение 18-20 ч при 30±1°C.

Используемые растворы

В работе использовали стандартный буферный раствор с величиной pH, равной 7.0. Были использованы образцы раствора с проводимостью 2.4; 5.0; и 10 мкСм/см.

Электропроводность определяли с помощью кондуктометра HANNA HI 8733 (США).

Антитела

Для получения антител, специфичных к соматическим антигенам бактерий, использовали методику иммунизации животных целыми бактериальными клетками, предварительно обработанными 2%-ным раствором глутарового альдегида (ГА). Культуру клеток выращивали в течение 18 ч на жидкой синтетической среде, отделяли центрифугированием, дважды отмывали в забуференном фосфатами физиологическом растворе (ЗФР) и переносили в тот же буфер, содержащий 2% ГА. Полученную суспензию хранили при +4°C. Непосредственно перед иммунизацией клетки дважды отмывали в ЗФР. Для иммунизации использовали суспензии клеток с оптической плотностью $A_{660}=0.5$ в кювете толщиной $l=1$ см, что соответствует их концентрации примерно 10^9 кл/мл. Животных иммунизировали 6 раз ежедневно внутривенным введением суспензий клеток объемом от 0.4 до 1.6 мл. Спустя неделю инъекции повторяли 4 раза (ежедневно), используя по 2 мл суспензии. Отбор крови проводили через 6 суток после последней иммунизации [Матора и др. (Matora et al.), 1998]. Антитела для работы любезно предоставил сотрудник лаборатории иммунохимии ИБФРМ РАН к.б.н., с.н.с. Г.Л. Бурыгин.

Проведение анализа с помощью электроакустического датчика

Исследование возможности регистрации биологических взаимодействий в проводящей суспензии проводилось с помощью двухканальной акустической линии задержки на основе пьезоэлектрической пластины Y-X ниобата лития толщиной 0.2 мм. Методом фотолитографии были

нанесены две пары встречно-штыревых преобразователей (ВШП) для возбуждения и приема акустической волны с поперечно-горизонтальной поляризацией нулевого порядка в каждом канале. Один из каналов линии задержки был электрически закорочен путем нанесения слоя алюминия на поверхность между ВШП, второй канал оставался электрически свободным. Жидкостной контейнер для суспензии объемом ~5 мл был закреплен на поверхности пластины между ВШП с помощью клея, не вносящего потери. Указанный датчик подключался к 4-портовому измерителю S параметров типа E5071C (Agilent). Методика детекции микробных клеток с помощью данного датчика основывалась на измерении временных зависимостей фазы и полных потерь выходного сигнала каждого канала датчика на фиксированной частоте 3.3 МГц (частота минимальных потерь) до и после взаимодействия микробных клеток с антителами.

Процесс измерения состоял из следующих этапов:

I – в измерительную ячейку вносили суспензию микробных клеток с заданной концентрацией и проводимостью и измеряли временные зависимости фазы и полных потерь выходного сигнала каждого канала на фиксированной частоте 3.3 МГц;

II – в измерительную ячейку вносили специфичные/неспецифичные антитела при продолжающемся измерении временных зависимостей фазы и полных потерь выходного сигнала каждого канала;

III – проводили анализ полученных данных относительно взаимодействия антител с микробными клетками. При этом наблюдались следующие ситуации:

III (а) – если антитела взаимодействовали с микробными клетками, значения регистрируемых параметров для суспензий клеток с антителами и без них значительно различались;

III (б) – если антитела не взаимодействовали с микробными клетками, то значения регистрируемых параметров для суспензий клеток с антителами и без них практически не различались.

Результаты и их обсуждение

Исследование проводилось на примере клеток *A. brasilense* Sp7 и O-специфичных антител в буферных растворах с проводимостью 2.4 – 10 мкСм/см. Исследовались суспензии с концентрацией клеток 10^4 , 10^6 и 10^8 кл/мл при концентрации антител 2.2 мкг/мл. Выбор данной концентрации антител был обусловлен ранее проведенными исследованиями [Гулий и др. (Guliy et al.), 2013]. Зависимости

изменения полных потерь и фазы выходного сигнала датчика вследствие добавления специфичных антител от проводимости буферного раствора представлены на рисунке 1 для клеток с концентрацией 10^4 , 10^6 и 10^8 кл/мл.

Из представленных данных видно, что во всех случаях изменения полных потерь и фазы выходного сигнала датчика в случае свободного канала линии

задержки значительно превышают по величине изменения этих параметров для закороченного канала. Представленные зависимости позволили подтвердить сделанный ранее вывод о том, что специфичное взаимодействие приводит к существенному увеличению проводимости суспензии клеток [Borodina et al., 2015].

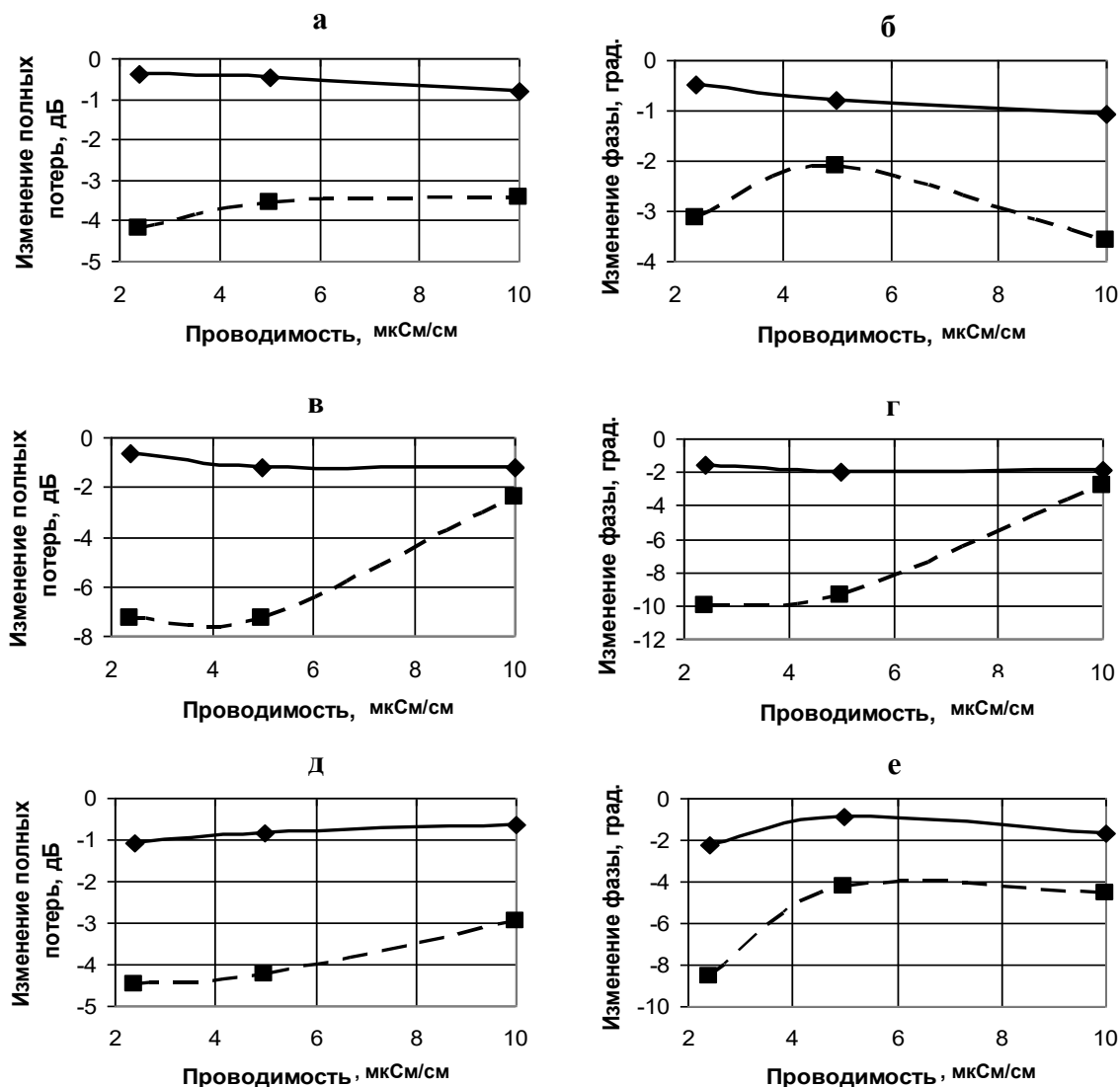


Рисунок 1. Зависимости изменения полных потерь (а, в, д) и фазы (б, г, е) выходного сигнала датчика от проводимости буферного раствора при специфичном взаимодействии «бактериальные клетки *A. brasilense* Sp7 - антитела». Пунктирная и сплошная кривые относятся к электрически свободной и электрически закороченной поверхностям линии задержки, соответственно, при концентрации клеток - 10^4 кл/мл (а, б), 10^6 кл/мл (в, г) и 10^8 кл/мл (д, е)

Согласно литературным данным, поверхностный заряд клеток зависит от целостности клеточных мембран. Повреждение мембран

микробных клеток ионами буферного раствора приводит к понижению клеточного потенциала [James, 1982].

В свою очередь, повреждение клеточных мембран, связанное с возрастанием их проницаемости, а, следовательно, и пассивного транспорта между внутри- и внеклеточными пространствами, приводит к понижению трансмембранных разностей потенциалов согласно уравнению Гольдмана. Помимо уменьшения заряда клеток при повреждении их мембран под действием буферного раствора с высокой ионной силой происходит снижение мембранных потенциалов клеток и дегидратации бактерий и, соответственно, поступлением во внеклеточную среду содержимого клетки. С увеличением проводимости буферного раствора количество клеток с поврежденными

мембранами увеличивается. Вероятно, что появление в измеряемой суспензии содержимого цитоплазмы микробных клеток приводит к дополнительному увеличению проводимости среды и этим объясняется некоторое уменьшение аналитического сигнала при проводимости буферного раствора выше 10 мкСм/см.

Дополнительно проводился эксперимент, в ходе которого в суспензию микробных клеток *E. coli* XL-1 добавлялись поликлональные Ат, специфичные только в отношении клеток *A. brasilense* Sp7. Было установлено, что в этом случае практически не происходило изменение полных потерь и фазы выходного сигнала датчика. (рис. 2 а, б).

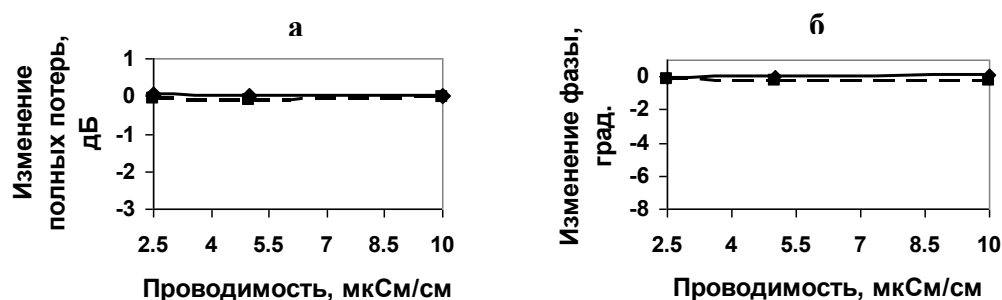


Рисунок 2. Зависимости изменения полных потерь (а) и фазы (б) выходного сигнала датчика от проводимости буферного раствора при неспецифичном взаимодействии «бактериальные клетки *E. coli* XL-1 – антитела, специфичные к клеткам *A. brasilense* Sp7».

Пунктирная и сплошная кривые относятся к электрически свободной и электрически закороченной поверхностям линии задержки, соответственно. Концентрация бактериальных клеток составляет 10^4 кл/мл.

Таким образом, в работе показана возможность детекции клеток азоспирилл при использовании специфичных антител с помощью биологического датчика на основе поперечно-горизонтальной волны в тонкой пластине ниобата лития. Установлено, что изменения полных потерь и фазы выходного сигнала датчика в результате специфичного взаимодействия «бактериальные клетки - антитела» при прочих равных условиях более значительны для электрически открытого канала линии задержки по сравнению с электрически закороченным каналом. Это означает то, что специфичное взаимодействие бактериальных клеток с антителами приводит к существенному увеличению проводимости суспензии. Степень изменения выходных параметров датчика зависит от концентрации клеток, что открывает возможность проведения не только качественного, но и количественного анализа бактерий. Полученные результаты показали хорошую чувствительность и быстродействие датчика. При этом нижний предел детекции составляет 10^4 кл/мл при проводимости буфера не более 10 мкСм/см.

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

Литература

1. Гулий О.И., Зайцев Б.Д., Кузнецова И.Е., Шихабудинов А.М., Караваева О.А., Дыкман Л.А., Староверов С.А., Игнатов О.В. Получение фаговых миниантител и их использование для детекции микробных клеток с помощью электроакустического датчика. *Биофизика*. 2012. Т.57, №3. С.460-467.
2. Гулий О.И., Зайцев Б.Д., Кузнецова И.Е., Шихабудинов А.М., Матора Л.Ю., Макарихина С.С., Игнатов О.В. Исследование специфического взаимодействия микробных клеток с поликлональными антителами при помощи резонатора с поперечным электрическим полем. *Микробиология*. 2013. Т. 82(2). С. 218–227.
3. Гулий О.И., Зайцев Б.Д., Бородина И.А., Теплых А.А., Игнатов О.В. Акустический метод анализа бактериальных клеток. *Биофизика*. 2016. Т. 61(4). С.744–757.

4. Матора Л.Ю., Шварцбург Б.И., Щеголев С.Ю. Иммунохимический анализ О-специфических полисахаридов почвенных азотфиксирующих бактерий *Azospirillum brasilense*. *Микробиология*. 1998. Т. 67(6). С. 815–820.
5. Borodina I., Zaitsev B., Shikhabudinov A., Guliy O., Ignatov O., Teplykh A. The biological sensor for detection of bacterial cells in liquid phase based on plate acoustic wave. *Physics Procedia*. 2015. V. 70. P. 1157–1160. doi:10.1016/j.phpro.2015.08.248
6. James A. The electrical properties and topochemistry of bacterial cells. *Adv. Colloid and Interface Sci.* 1982. V. 15. P. 171–221. doi:10.1016/0001-8686(82)80001-8
7. Maurer M., Gujer W. Monitoring of microbial phosphorus release in batch experiments using electric conductivity. *Water Research*. 1995. V. 29, I. 11. P. 2613–2617. doi: 10.1016/0043-1354(95)00146-C
8. Pinkham W., French L., Frankel D., Vetelino J. A lateral field excited acoustic wave pesticide sensor. *Proc. IEEE Ultrasonics Symposium*. Rotterdam, September, 18 – 21, 2005. P. 2279-2283. doi: 10.1109/ULTSYM.2005.1603339
9. Wark M., Kalanyan B., Ellis L., Fick J., Connel L., Neivandt D., Vetelino F. A lateral field excited acoustic wave sensor for the detection of saxitoxin in water. *Proc. of IEEE Ultrasonics Symposium*. 2007. P. 1217–1220. doi: 10.1109/ULTSYM.2007.306
10. Zaitsev B.D., Kuznetsova I.E., Shikhabudinov A.M., Ignatov O.V., Guliy O.I. Biological Sensor Based on the Lateral Electric Field Excited Resonator. *Trans. on Ultrason. Ferroel. Freq. Contr.* 2012. V. 59. I. 5. P. 963–969. doi: 10.1109/TUFFC.2012.2281

References

1. Borodina I., Zaitsev B., Shikhabudinov A., Guliy O., Ignatov O., Teplykh A. The biological sensor for detection of bacterial cells in liquid phase based on plate acoustic wave. *Physics Procedia*. 2015. V. 70. P. 1157–1160. doi:10.1016/j.phpro.2015.08.248
2. Guliy O.I., Zaitsev B.D., Kuznetsova I.E., Shikhabudinov A.M., Karavaeva O. A., Dykman L.A., Staroverov S. A., Ignatov O.V. Obtaining phage mini-antibodies and using them for detection of microbial cells with an electroacoustic sensor.

3. Guliy O.I., Zaitsev B.D., Kuznetsova I.E., Shikhabudinov A.M., Matora L.Yu., Makarikhina S.S., Ignatov O.V. Investigation of specific interactions between microbial cells and polyclonal antibodies using a resonator with lateral electric field. *Microbiology*. 2013. V. 82, No. 2. P. 215–223. doi: 10.7868/S0026365613020055 (In Russian).
4. Guliy O.I., Zaitsev B.D., Borodina I.A., Teplykh A.A., Ignatov O.V. The acoustic method for bacterial cells analysis. *Biophysics*. 2016. V. 61, No. 4. P. 629–639]. doi:10.1134/S0006350916040138 (In Russian).
5. James A. The electrical properties and topochemistry of bacterial cells. *Adv. Colloid and Interface Sci.* 1982. V. 15. P. 171–221. doi:10.1016/0001-8686(82)80001-8
6. Matora L.Yu., Shvartsburd B., Shchegolev S.Yu. Immunochemical analysis of O-specific polysaccharides from the soil nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasilense*. *Microbiology (Mikrobiologiya)*. 1998. V. 67(6). P. 815–820. (In Russian).
7. Maurer M., Gujer W. Monitoring of microbial phosphorus release in batch experiments using electric conductivity. *Water Research*. 1995. V. 29, I. 11. P. 2613–2617. doi: 10.1016/0043-1354(95)00146-C
8. Pinkham W., French L., Frankel D., Vetelino J. A lateral field excited acoustic wave pesticide sensor. *Proc. IEEE Ultrasonics Symposium*. Rotterdam, September, 18 – 21, 2005. P. 2279-2283. doi: 10.1109/ULTSYM.2005.1603339
9. Wark M., Kalanyan B., Ellis L., Fick J., Connel L., Neivandt D., Vetelino F. A lateral field excited acoustic wave sensor for the detection of saxitoxin in water. *Proc. of IEEE Ultrasonics Symposium*. 2007. P. 1217–1220. doi: 10.1109/ULTSYM.2007.306
10. Zaitsev B.D., Kuznetsova I.E., Shikhabudinov A.M., Ignatov O.V., Guliy O.I. Biological Sensor Based on the Lateral Electric Field Excited Resonator. *Trans. on Ultrason. Ferroel. Freq. Contr.* 2012. V. 59. I. 5. P. 963–969. doi: 10.1109/TUFFC.2012.2281