

УДК 57.083.2

СПЕЦИФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ *E. coli* В ПРИ ПОМОЩИ БАКТЕРИОФАГА Т4, НАНОФИЛЬТРОВ И АТФ-МЕТРИИ

О.А. Миних^{1,2}, Л.Ю. Бровко¹, М.У. Гриффите¹, Н.Н. Угарова²

¹Институт по безопасности пищи Университета г. Гвелфа, Канада; ²кафедра химической энзимологии химического факультета МГУ; e-mail: minikh-olga@yandex.ru

Литический бактериофаг и фильтры на основе наноалюминиевых волокон «*Disruptor 4601*» использованы для специфического определения бактериальной обсемененности методом АТФ-метрии. В качестве модельной системы выбрана система: бактериофаг Т4–*E. coli* В. Модификации метода позволяют либо количественное определение *E. coli* В с нижним пределом, равным $1,0 \cdot 10^3$ КОЕ/мл, либо детекцию *E. coli* В в присутствии 60-кратного избытка *S. typhimurium*. Обе характеристики значительно улучшены по сравнению со стандартным методом с применением фага Т4. Время, затраченное на анализ, увеличивается незначительно.

Ключевые слова: бактериофаг Т4, бактериальная обсемененность, *E. coli* В, биоломинесценция, АТФ, наноалюминиевые волокна.

Своевременная детекция патогенных бактерий в пище и окружающей среде – важный шаг на пути к высоким стандартам микробиологического контроля. Стандартные микробиологические методы обычно занимают от 2 до 5 дней, чтобы определить и подтвердить наличие патогенов в исследуемых образцах. Часто это является неприемлемым, поэтому последние 20 лет интенсивно разрабатываются методы быстрой детекции. Наиболее широко используются методы на основе детекции антигенов и нуклеиновых кислот [1]. Тем не менее для иммуноанализа необходимо наличие 10^4 – 10^5 КОЕ/мл образца [2, 3], а для успешного проведения полимеразно-цепной реакции (ПЦР) наличие как минимум 200 клеток в образце [4]. Более того, чувствительность обоих методов сильно ограничивается сложностью матрицы и неравномерным распределением клеток-мишеней в образце [1, 3]. Ранее было показано, что методы на основе бактериофагов могут успешно применяться для быстрой детекции патогенных микроорганизмов [2, 5–9]. В основе этих методов лежит принцип того, что фаг быстро и специфично атакует клетку и как следствие лизирует ее. Анализ посредством лизиса фагом клеток-мишеней с последующей АТФ-метрией позволяет достоверно определять 10^4 КОЕ/мл в течение 1–2 ч в присутствии неспецифической микрофлоры [7]. Увеличение чувствительности анализа может достигаться за счет концентрирования клеток в образце перед детекцией. Перспективным может

быть использование нанофильтров «*Disruptor 4610*» («*Ahlstrom*», США), состоящих из наноалюминиевых волокон с порами 2 мкм, которые обладают положительным зарядом. Эти нанофильтры показали высокую эффективность адсорбции бактерий и вирусов при фильтрации образца без избыточного давления [10]. Цель данной работы – сравнение эффективности различных способов применения данных нанофильтров для детекции *E. coli* путем лизиса клеток фагом Т4 и последующее измерение содержания клеток с помощью биоломинесцентной АТФ-метрии [3, 11, 12]. Мы исследовали две системы: 1) концентрированный раствор фага добавляли к клеткам, предварительно сконцентрированным на нанофилт্রে; 2) клетки концентрировали на филт্রে, на котором предварительно сорбировали фаг. Были рассчитаны степень удержания бактерий на филт্রে и параметры детекции клеток *E. coli* путем лизиса фагом и последующей биоломинесцентной АТФ-метрии.

Материалы и методы

Бактериофаг и бактериальные штаммы. Штаммы клеток *E. coli* В и *S. typhimurium*, а также бактериофаг Т4 были получены из коллекции Канадского исследовательского Института по безопасности пищи*. Бактериальные клетки выращивали (37°C, 200 об/мин) в инкубаторе-шейкере «*NBS Benchtop*» («*New Brunswick Scientific Co., Inc.*», Канада) в течение 14–16 ч в Лурия–Бертрани среде/агаре (LB)

*Canadian Research Institute for Food Safety, University of Guelph 43 McGilvray St., Guelph, Ontario, N1G 2W1 Canada (mgriffit@uoguelph.ca).

(«Difco», США). Ночную культуру центрифугировали (10 мин, 4000g) в центрифуге «Beckman J2-МС» («Beckman Instruments Inc.», США) и ресуспендировали в соответствующей среде. Подсчет клеток (КОЕ/мл) проводили путем высева на чашки с LB-агаром по 0,1 мл серийных разбавлений.

Наращивание и подсчет бактериофага проводили с использованием полутвердого агара [13]. Полученный препарат фага центрифугировали (10 мин, 6000 g). Супернатант фильтровали через стерильный фильтр (поры 0,2 мкм) «VacuCap 60 PF» («Pall Corp.», Канада), затем диализовали с использованием диализных кассет 10 000 MW («Slide-A-Lyzer», «Pierce», США), чтобы сменить среду на SM-буфер (50 mM Трис-НСl, pH 7,5 («Fisher Scientific», США), 100 mM NaCl, 8 mM MgSO₄, 0,01% желатин («Sigma-Aldrich», США)) и хранили при 4°C.

Детекция бактерий *E. coli* B с использованием бактериофага T4 и биолюминесцентной АТФ-метрии. Для построения калибровочной кривой 0,1 мл клеточной суспензии (концентрация от 12 до 1·10⁸ КОЕ/мл) в минимальной среде Дэвис («Difco», США), содержащей 1% декстрозы (Minimal Davis Media 1% Dextrose, MDD) и 0,077 мл 1,3·10¹¹ БОЕ/мл фага T4 были смешаны со средой MDD так, чтобы достичь конечного объема 1 мл. Образцы инкубировали в инкубаторе-шейкере «NBS Benchtop» («New Brunswick Scientific Co., Inc.», Канада) в течение 1 ч (37°C, 200 об/мин), затем измеряли концентрацию внеклеточной АТФ. Для этого в кювету люминометра модели «P1» («GEM Biomedical», США) вносили 0,05 мл суспензии бактерий или смеси бактерий с фагом, добавляли 0,10 мл люциферин-люциферазного биолюминесцентного реагента (BLR) «Aqua Trace» («Biotrace», Великобритания) и измеряли интенсивность сигнала за 10 с, которую выражали в относительных световых единицах (RLU). Фоновый сигнал измеряли перед началом эксперимента. Для полученных значений интенсивности (RLU) находили значение десятичного логарифма, (lg(RLU)), и строили зависимость следующего вида:

$$\lg(\text{RLU}) = a + m \cdot \lg(\text{КОЕ/мл}).$$

Иммобилизация бактериофага T4 путем физической сорбции на нанопористых «Disruptor 4610» («Ahlstrom», США). В работе использовали фильтры «Disruptor 4610» из анодированных алюминия во-

локон (далее нанопористые), любезно предоставленные корпорацией «Ahlstrom» (США). Нанопористые – положительно-заряженные фильтры с толщиной 0,8 мм и порами 2 мкм. Раствор бактериофага T4 объемом 0,05 мл (1,7·10⁹ БОЕ/мл) наносили на поверхность фильтра (диаметр 1 см) и выдерживали 15–30 мин при комнатной температуре (RT). Затем через фильтр пропускали 10 мл фосфатного буфера («Pierce», США). Подсчитывали число бактериофагообразующих единиц в исходном растворе и фильтрате и по разнице определяли количество иммобилизованного фага.

Фильтрация суспензии клеток *E. coli* B через нанопористые. Нанопористый помещали в держатель (диаметр 1 см, «Millipore», США) и фильтровали через него 10 мл бактериальной суспензии (10–1·10⁷ КОЕ/мл). Среднее время контакта образца с фильтром составляло ~2 мин. Подсчет бактерий в фильтрате проводили путем высева на чашку с LB-агаром. Степень эффективности удержания бактерий рассчитывали как отношение количества бактерий, удержанных на фильтре, к общему количеству бактерий в образце.

Детекция клеток *E. coli* с использованием нанопористых и АТФ-метрии. В работе использовали два метода детекции клеток *E. coli*.

Метод А. 10 мл бактериальной суспензии (10–1·10⁷ КОЕ/мл) фильтровали через нанопористый, как описано выше. Фильтр с удержанными бактериями помещали в пробирку, добавляли 0,10 мл 1·10¹⁰ БОЕ/мл T4 (в среде MDD*) и инкубировали в течение часа (37°C, 200 об/мин). Затем отбирали 0,05 мл супернатанта, помещали в кювету люминометра, добавляли 0,05 мл BLR** и измеряли интенсивность биолюминесценции.

Метод Б. 10 мл бактериальной суспензии (10–1·10⁷ КОЕ/мл) фильтровали через нанопористый с иммобилизованным на нем фагом. Влажный фильтр вносили в кювету люминометра, инкубировали в течение 1 ч при перемешивании (37°C, 200 об/мин), затем добавляли 0,05 мл среды MDD и 0,05 мл BLR и измеряли интенсивность биолюминесценции.

Все эксперименты проводили как для чистой культуры *E. coli* B, так и для ее смеси с *S. typhimurium*. В последнем случае инкубацию проводили в фосфатном буфере, а не в среде MDD.

Статистическая обработка данных. Во всех экспериментах использовали по три образца. Для каж-

*Минимальная среда Дэвис; **реагент для измерения биолюминесценции.

дого образца находили величины $\lg(\text{RLU})$, затем рассчитывали средние значения $\lg(\text{RLU})$ и определяли для них стандартные отклонения (SD) с помощью программного обеспечения Excel (Microsoft Office, 2007). Статистические параметры рассчитывали, как описано ранее [14], используя следующие уравнения:

предел детекции сигнала (SDL)

$$\lg(\text{SDL}) = \lg(\text{RLU})_{\text{фон}} + 3 \times \text{SD};$$

предел количественной детекции сигнала (SQL)

$$\lg(\text{SQL}) = \lg(\text{RLU})_{\text{фон}} + 10 \times \text{SD};$$

предел обнаружения (минимальный предел обнаружения, LOD)

$$\lg(\text{LOD}) = (\lg(\text{RLU})_{\text{фон}} + 3 \times \text{SD} - a) / m;$$

нижний предел количественного определения (LOQ)

$$\lg(\text{LOQ}) = (\lg(\text{RLU})_{\text{фон}} + 10 \times \text{SD} - a) / m,$$

где m – наклон калибровочной прямой, SD – стандартное отклонение для фонового сигнала. Линейность калибровочной прямой оценивали с помощью корреляционного коэффициента (R^2).

Специфичность – способность метода отличать аналит от других компонентов образца. В нашем случае специфичность (способность отличить *E. coli B* от *S. typhimurium* в их смеси) была определена как *отклонение* от истинного значения (чистая культура *E. coli B*) в процентах. Таким образом, специфичность для смешанных культур была представлена в следующем виде: $100 \pm \text{отклонение}, \%$, где допустимое значение *отклонения* не должно превышать 10%.

Результаты и их обсуждение

Иммобилизация бактериофага на нанофильтрах. Бактериофаг T4 был иммобилизован на нанофильтрах, как описано выше ($1,7 \cdot 10^9$ КОЕ/фильтр). Число фагов в фильтрате составило $(7-9) \cdot 10^8$ БОЕ в 10 мл суспензии, т.е. 40–50% фаговых частиц иммобилизовалось на фильтре. Таким образом, число фагов на фильтре составляет $(6,8-8,5) \cdot 10^8$ БОЕ. Степень задержания бактериофага T4 нанофильтрами «Disruptor 4610» немного меньше по сравнению с данными, опубликованными для энтеровирусов при их фильтрации через положительно заряженные керамические нанофильтры [10], что можно объяснить разными значениями электроотрицательности между исследованными вирусами.

Применение нанофильтров «Disruptor 4610» для концентрирования клеток *E. coli*. 10 мл суспензий *E. coli* в диапазоне концентраций $10-$

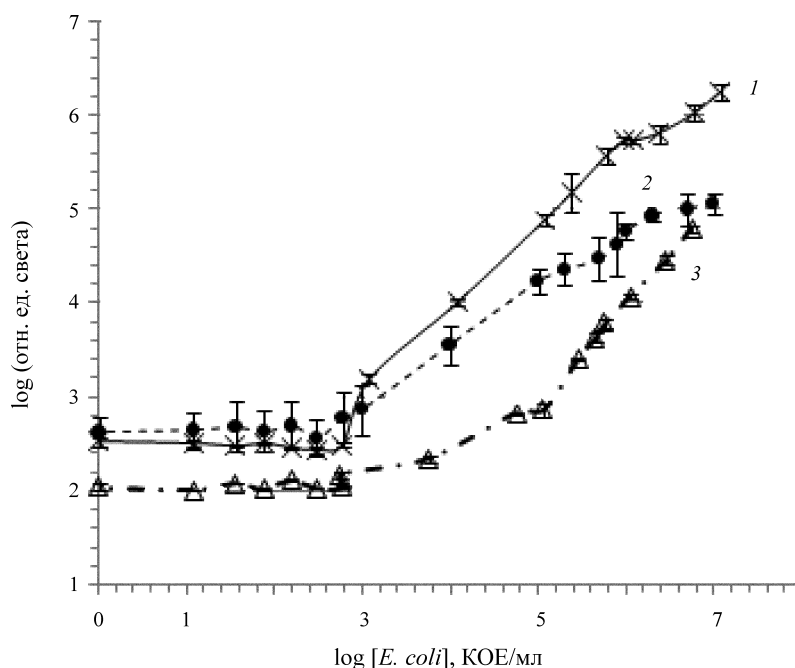
$1 \cdot 10^7$ КОЕ/мл фильтровали через нанофильтры. Степень удержания бактерий фильтром составила 99,9% для суспензий с концентрацией до $1 \cdot 10^7$ КОЕ/мл включительно.

Детекция *E. coli B* при помощи нанофильтров и метода биолюминесцентной АТФ-метрии. Образцы *E. coli* ($12-1 \cdot 10^7$ КОЕ/мл) мы пропускали через нанофильтры «Disruptor 4601», затем раствор T4 (10^{10} БОЕ/мл) добавляли к фильтрам (метод А). Этот подход сопоставили с другим методом, когда суспензию *E. coli* пропускали через фильтры с уже иммобилизованным фагом (метод Б). В обоих методах лизис клеток измеряли при помощи биолюминесцентной АТФ-метрии путем добавления люциферин-люциферазного реагента. Результаты представлены на рисунке и в таблице. По данным рисунка видно, что предел обнаружения (LOD) для прямого метода (T4–*E. coli B*) равен 10^4 КОЕ/мл, что согласуется с данными, полученными ранее [3, 11]. Для метода А наклон градуировочной прямой значительно выше по сравнению с прямым методом и LOD равен ~ 500 КОЕ/мл, LOD для метода Б составляет 766 КОЕ/мл. Таким образом, чувствительность методов А и Б в $\sim 15-20$ раз выше чувствительности прямого метода.

Для анализа с помощью нанофильтров «Disruptor 4601» необходимо 10 мл клеточной суспензии, тогда как для прямого метода требуется 50 мкл. Таким образом, при использовании методов на основе нанофильтров объем необходимой суспензии возрастает в 200 раз, а чувствительность увеличивается только в 20 раз. Более низкая чувствительность, чем ожидалось, может быть объяснена неполным лизисом клеток. В самом деле, толщина нанофильтров «Disruptor 4601» составляет 0,8 мм, что усложняет контакт фага (в случае метода А) с бактериями, которые проникли внутрь. Помимо этого для методов на основе нанофильтров были получены более высокие стандартные отклонения (SD), что обуславливает увеличение LOD.

Методы с использованием нанофильтров показали хорошую специфичность детекции *E. coli* в смеси с *S. typhimurium*. Метод А позволяет определять *E. coli B* ($7 \cdot 10^4$ КОЕ/мл) при 8-кратном присутствии *S. typhimurium* с отклонением от значения для чистой культуры 7%, что не превышает допустимого 10%-го отклонения. Метод Б при 60-кратном избытке ($3 \cdot 10^4$ КОЕ/мл *E. coli B*) *S. typhimurium* дает 4%-е отклонение сигнала от значения для чистой культуры.

*Фоновый сигнал буфера (фон).



Зависимость интенсивности биолюминесценции от концентрации *E. coli B* (КОЕ/мл). Используемые методы определения: на основе Т4 с «Disruptor 4601» (метод А (кривая 1)); метод Б (кривая 2)); прямой анализ Т4–*E. coli B* (кривая 3). Условия: концентрация Т4 – 10^{10} БОЕ/мл, инкубация при 37°C, 200 об/мин, 1 ч. Данные представлены в виде среднего значения для трех повторов (RLU) как среднее \pm SD

Аналитические параметры методов специфической детекции *E. coli B* с использованием бактериофага Т4 с нанофильтрами «Disruptor 4601» (методы А и Б) и без фильтров (прямой метод). Интервал концентраций клеток, использованный для определения аналитических параметров, $300\text{--}10^6$ КОЕ/мл *E. coli B*

Диапазон применения	300–10 ⁶ КОЕ/мл <i>E. coli B</i>		
	метод А	метод В	прямой Т4– <i>E. coli B</i> метод
Предел определения	495 КОЕ/мл	766 КОЕ/мл	$1,03 \times 10^3$ КОЕ/мл
Предел количественного определения	985 КОЕ/мл	$4,86 \times 10^3$ КОЕ/мл	$2,74 \times 10^3$ КОЕ/мл
Пороговый сигнал	432 RLU	676 RLU	139 RLU
Пороговый сигнал количественного определения	824 RLU	$2,1 \times 10^3$ RLU	249 RLU
Уравнение калибровочной кривой для log RLU	$0,94 \times \log[E. coli] + 0,11$	$0,61 \times \log[E. coli] + 1,06$	$0,53 \times \log[E. coli] + 0,54$
Чувствительность	0,94	0,61	0,53
R ²	0,992	0,995	0,921

Прямой метод (Т4–*E. coli B*) показывает более слабые результаты для смешанной культуры: при 5-кратном избытке *Salmonella* метод дает 8%-е отклонение, а при 10-кратном избытке отклонение превышает допустимое 10%-е отклонение от значения для чистой

культуры. Высокая специфичность методов на основе нанофильтров может быть обусловлена более высокой концентрацией бактерий в смеси с фагом по сравнению с прямым методом. В случае метода Б, добавочным фактором служит эффективный контакт клет-

ка-фаг за счет избыточного давления во время фильтрации бактериальной суспензии через фильтр с фагом, что приводит к более полному лизису клеток-мишеней вопреки наличию избытка посторонней микрофлоры.

Таким образом, методы на основе Т4-бактериофага и нанофильтров показывают хорошие результаты детекции *E. coli B* как в чистой, так и в смешанной культурах. Преимущество метода Б состоит в том, что фаг иммобилизуется на фильтре за счет физичес-

кой сорбции, а следовательно, отсутствует необходимость его химической или геноинженерной модификации, которые могут приводить к ухудшению литической активности фага. Метод позволяет также определять бактерии-мишени при высоком избытке посторонней микрофлоры. Все это указывает на возможность практического применения системы на основе использования бактериофага Т4 и нанофильтров для специфического определения патогенных бактерий.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке «SENTINEL» – Сети по разработке биоактивной бумаги «NSERC» (*National Science and Engineering Research Council, Национальный комитет по науке и технике Канады*) и Министерства Онтарио по Сельскому хозяйству и пище «OMAF».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Abubakar I. et al.* // Health Technology Assessment. 2007. **11**. 36.
2. *Squirrell D.J., Price R.L., Murphy M.J.* // Analytica Chimica Acta. 2002. **457**. P. 109.
3. *Gracias K.S., McKillip J.L.* // Can. J. Microbiol. 2004. 50(11): P. 883.
4. *Fung D.Y.C.* // Comprehensive reviews in food science and food safety. 2002. **1**. P. 3.
5. *Favrin S.J., Jassim S.A., Griffiths M.W.* // Int J Food Microbiol. 2003. **85**. P. 63.
6. *Wu Y., Brovko L., Griffiths M.W.* // Lett. Appl. Microbiol. 2001. **33**. N 4. P. 311.
7. *Blasco R. et al.* // J. Appl. Microbiol. 1998. **84**. N 4. P. 661.
8. *Edgar R. et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 2006. **103**. N 13. P. 4841.
9. *Goodridge L., Chen J., Griffiths M.* // J. Food Microbiol. 1999. **47**. N 1-2. P. 43.
10. *Karim M.R. et al.* // Appl. Environ. Microbiol. 2009. **75**. N 8. P. 2393.
11. *Rees C.E.D., Loessner M.J.* // Bacteriophages: biology and applications / Ed. E. Kutter, A. Sulakvelidze. 2005. P. 267.
12. *Угарова Н.Н., Фрунджян В.Г.* Применение биолуминесцентной АТФ-метрии в биоаналитических целях. М., 2003.
13. *Sambrook J., Russell D.W.* Molecular Cloning: a laboratory manual. N.Y., 2001.
14. *Harris D.C.* Quantitative Chemical Analysis / Ed. D.C. Harris. N.Y., 2007. P. 78.

Поступила в редакцию 20.01.10

SPECIFIC *E. coli B* DETECTION USING T4 BACTERIOPHAGE, NANO-FILTERS AND ATP-BIOLUMINESCENCE

O. A. Minikh, L.Y. Brovko, M.W. Griffiths, N.N. Ugarova

(Department of chemical enzymology; Canadian Research Institute for Food Safety, University of Guelph)

Lytic bacteriophage and filters based on nano-aluminium fibers “Disruptor 4601” were proposed to detect specific bacteria by ATP-bioluminescence. As a model system, system of T4 bacteriophage – bacteria *E. coli B* was chosen. Modifications of nano-filter based method with wild type T4 bacteriophage allow either quantitative detection of *E. coli B* with detection limit as low as 10^3 CFU/mL or accurate detection *E. coli B* at the 60-fold excess of *S. typhimurium*. Thus, T4 phage coupled with nano-filter media method performs much better than T4 coupled with the standard phage-mediated ATP-bioluminescence method. Increase in testing time required is not essential.

Key words: bacteriophage T4, bacterial contamination, *E. coli B*, bioluminescence, ATP, nano-aluminium fibers.

Миних Ольга Александровна – сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ (*minikh-olga@yandex.ru*); Бровко Любовь Юлиевна – профессор Института по безопасности пищи Университета г. Гвелфа, докт. хим. наук (*lbrovko@uoguelph.ca*); Гриффитс Мансел – профессор Института по безопасности пищи Университета г. Гвелфа, докт. хим. наук (*mgriffit@uoguelph.ca*); Угарова Наталья Николаевна – глав. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, докт. хим. наук (*nugarova@gmail.com*).