МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

«Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова»

Факультет ветеринарной медицины, пищевых и биотехнологий

Кафедра микробиологии, биотехнологии и химии

ДОПУЩЕНО к защите:

Зав. кафедрой_____ О.С. Ларионова

«____» _____ 20___ г.

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Магистерская диссертация на тему:

«Изучение антибактериальной активности ампициллина биологическим датчиком на основе сверхвысокочастотного резонатора»

Направление подготовки

19.04.01 Биотехнология

Направленность (профиль)

Биотехнология

Обучающийся:
Бородина Мария Александровна _____
(подпись)

Руководитель выпускной квалификационной работы:
доцент, д. биол. наук, Ларионова Ольга Сергеевна _____
(подпись)

Рецензент:
д. биол. наук, _____
главный науч. сотрудник отдела экспериментальных *(подпись)*
фармацевтических форм ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора
Комиссаров Александр Владимирович

Саратов 2021

Содержание

Введение……..4

Раздел 1 Аналитический обзор научно-технической информации……...6

1.1 Требования и свойства, предъявляемые к антибактериальным препаратам……...6

1.2 Факторы и механизмы образования антибиотикорезистентных микроорганизмов……8

1.3 Способы определения активности антибактериальных препаратов на бактериальные клетки……..14

1.3.1 Традиционные методы анализа антибактериальной активности препаратов……...14

1.3.2 Альтернативные методы исследования антибактериальной активности препаратов……16

1.4 Контроль антибактериальной активности антибиотиков в процессе производства……..22

1.5 Перспективы использования биосенсоров при изучении антибактериальных препаратов……23

Раздел 2 Объекты, материалы и методы исследования……28

2.1 Характеристика исходных веществ и материалов……28

2.1.1 β-лактамные антибиотики. Ампициллин……...28

2.1.2 Адсорбирующие полимерные пленки полистирола…….30

2.2 Характеристика биологического объекта – *Escherichia coli* XL-1 Blue ……...32

2.3 Методики исследования……...35

2.3.1 Культивирование бактериальных клеток……..35

2.3.2 Формирование и модификация пленок полистирола плазменным травлением с помощью ВЧ разряда……..36

2.3.3 Иммобилизация микробных клеток на модифицированных пленках……...36

2.3.4 Регистрация биологических взаимодействий при помощи СВЧ резонатора…….38

Раздел 3 Результаты исследований и их анализ……40

3.1 Результаты атомно-силовой микроскопии иммобилизованных бактериальных клеток……...40

3.2 Результаты оценки жизнеспособности бактерий, иммобилизованных на ПС…….42

3.3 Показатели антибактериальной активности ампициллина с помощью СВЧ резонатора……46

Заключение……...54

Выводы……..56

Практические предложения производству……57

Список источников литературы……..58

Приложения……..67

Введение

В современном мире наблюдается активное использование антибиотиков в медицине, ветеринарии, пищевой промышленности при консервировании и для обработки пищевых продуктов при транспортировке. Активное применение антибиотиков приводит к формированию антибиотикоустойчивости (резистентности) бактерий. Резистентность – это неизбежное биологическое явление, связанное с высокими адаптационными способностями микроорганизмов, и предотвратить ее практически невозможно. Одним из основных моментов при назначении антибиотикотерапии, является анализ активности планируемого препарата в отношении бактериальной флоры [24].

Изучение антибактериальной активности препаратов является важнейшей и в то же время едва ли не самой трудоемкой и затратной процедурой в микробиологической лаборатории. Поэтому разработка новых технологий и методов определения эффективности антимикробных препаратов весьма актуальна для микробиологии, медицины, ветеринарии и биотехнологии.

В связи с этим существует необходимость в разработке недорогих и менее затратных по времени экспресс-тестов, которые должны отвечать следующим требованиям: высокая чувствительность, специфичность, оперативность, доступность, простота в использовании и автономность.

Одним из перспективных направлений для регистрации влияния антибактериальных препаратов на микробные клетки являются биосенсорные системы, которые отличают высокая чувствительность и селективность, оперативность получения результата и возможность работы вне лабораторных условий.

При разработке таких биосенсорных систем, которые содержат клетки микроорганизмов, активно используется их иммобилизация.

Целью работы являлась оценка воздействия ампициллина на микробные клетки, иммобилизованные на пленках полистирола, с помощью датчика на основе электродинамического сверхвысокочастотного резонатора для определения антибактериальной активности препарата.

Для достижения поставленной цели были поставлены следующие задачи:

1) Определить возможности иммобилизации бактериальных клеток на поверхности пленок полистирола, модифицированных плазменной обработкой.

2) Оценить время сохранения жизнеспособности бактерий после иммобилизации на модифицированных пленках полистирола.

3) Провести оценку активности антибиотика в исследуемом диапазоне концентраций с помощью микробного датчика на основе электродинамического СВЧ резонатора.

Раздел 1 Аналитический обзор научно-технической информации

1.1 Требования и свойства, предъявляемые к антибактериальным препаратам

С момента открытия пенициллина в 1929 году человечество использовало этот мощный инструмент в борьбе против бактериальных заболеваний.

Одним из основных моментов при использовании антибиотиков является сохранение их стабильности и антибактериальной активности. Существует два метода определения стабильности антибиотиков: классический метод и метод "ускоренного старения". В рамках первого метода лекарственное средство в течение срока годности хранят с соблюдением требуемых условий и анализируют активность каждые полгода или каждый год в зависимости от срока годности. Затем дают заключение об оптимальном сроке хранения. Однако это длительный метод. Метод "ускоренного старения" позволяет за 15-115 дней при температуре 40-70ºС установить срок годности лекарственного средства. Этот метод основан на изучении кинетики реакций разложения лекарственных веществ. Определение ведут в климатических шкафах автоматически создающих заданные условия хранения: температуру, влажность, свет. Исследуя физические и химические изменения вещества, оценивают его стабильность [29].

Современная медицинская практика предъявляет следующие основные требования к антимикробным препаратам:

- высокая избирательность антимикробного эффекта в дозах, нетоксичных для организма;

- отсутствие или медленное развитие резистентности возбудителей к препарату в процессе его применения;
- сохранение антимикробного эффекта в жидкостях организма, экссудатах и тканях, отсутствие или низкий уровень инактивации белками сыворотки крови, тканевыми энзимами;
- хорошее всасывание, распределение и выведение препарата, обеспечивающие терапевтические концентрации в крови, тканях и жидкостях организма, которые должны быстро достигаться и поддерживаться в течение длительного периода;
- удобная лекарственная форма для различных возрастных групп и локализации процесса, обеспечивающая максимальный эффект и стабильность в обычных условиях хранения [22].

Практически ни один из препаратов антибиотиков не отвечает всем перечисленным требованиям. Повышение степени чистоты препаратов, освобождение их от сопутствующих примесей, создание производных, обладающих новыми ценными свойствами (активность в отношении устойчивых возбудителей, пролонгация действия и др.), позволяют значительно расширить область применения антибиотика, увеличить его стабильность и повысить его эффективность.

Развитие резистентности у микроорганизмов является основным фактором, ограничивающим эффективность антибактериальных препаратов. В связи с этим актуальным становится не только поиск новых путей предупреждения формирования устойчивости возбудителей бактериальных инфекций, но и своевременного определения антибактериальной эффективности имеющегося противобактериального препарата.

1.2 Факторы и механизмы образования антибиотикорезистентных микроорганизмов

Развитие антибиотикорезистентности бактерий является основным фактором, ограничивающим эффективность антибактериальных препаратов. Под антибиотикорезистентностью понимают способность к росту и делению микроорганизмов при воздействии на них антибактериальных препаратов. По степени чувствительности к антибактериальным средствам микроорганизмы делят на группы [3, 30]. При высокой чувствительности прекращение роста, размножения или гибель возбудителя в организме животного и человека происходит при терапевтической концентрации препарата. При умеренной чувствительности для получения такого результата необходимы максимальные дозы антибиотика. При низкой чувствительности эффекта можно добиться только *in vitro* в концентрациях, токсичных для организма.

Под устойчивостью подразумевается способность к размножению возбудителя в присутствии терапевтических концентраций препарата. При использовании препаратов, к которым у микроорганизмов отмечена низкая чувствительность или резистентность, они, не только не уничтожают возбудителя, но и может происходить генерализация процесса, который заключается в том, что другие микроорганизмы, в том числе представители нормальной флоры, могут сохранить чувствительность к антибиотику и погибнуть. Это дает возможность устойчивым видам и штаммам, в первую очередь, представителям сапрофитной патогенной микрофлоры, занять освободившиеся экологические ниши в организме. При отсутствии основного эффекта сохраняются все возможные побочные действия (аллергенность, иммунодепрессивный эффект, гепатотоксичность и другие) [5].

В любом случае резистентность бактерий связана с нарушением взаимодействия антибиотика и его мишени. У бактерий такое явление

наблюдается на уровне бактериальной клетки при ее взаимодействии с препаратом.

Классическими считаются такие типы механизмов резистентности микроорганизмов к антибиотикам:

- потеря клеткой жизненно важных компонентов через поры в мембране,
- потеря энергетического потенциала клетки,
- разрушение мембранных комплексов,
- подавление обменных процессов,
- накопление в клетках воды, вызывающее набухание и возможный ее лизис, что приводят к гибели микробной клетки [41, 53].

Описаны биохимические и генетические механизмы формирования устойчивости микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Известные на сегодняшний день биохимические механизмы резистентности микроорганизмов можно подразделить на несколько групп.

К первой группе относится модификация мишени действия антибактериальных препаратов. Структура мишеней действия антибактериальных веществ подвержена изменчивости в результате спонтанных мутаций в кодирующих их генах или иных генетических событий. Часть таких изменений может привести к снижению (или утрате) способности мишени связываться с антибиотиками. Механизмы инактивации существовали у бактерий, продуцирующих антибиотики, задолго до начала использования этих веществ в качестве медицинских препаратов. Скорее всего, они выполняли функции защиты бактерии-продуцента от собственного антибиотика [41].

Ко второй группе биохимического фактора и механизма формирования устойчивости бактерий к антибактериальным препаратам (АБП) можно отнести нарушение проницаемости оболочки микробной клетки. Этот механизм распространен чаще среди грамотрицательных бактерий, обладающих внешней мембраной, и является наименее специфичным в

отношении АБП разных групп. Транспорт гидрофильных антибиотиков внутрь микробной клетки происходит через пуриновые каналы. Эффективность перехода определяет уровень природной чувствительности бактерий к антибиотикам.

К третьей группе следует отнести генетические механизмы развития антибактериальной резистентности, т.е. приобретение новых для бактерии генов детерминант устойчивости. Чаще всего новые для бактерий детерминанты резистентности приобретаются с подвижными генетическими элементами – плазмидами и транспозонами. Обычно с подвижными элементами передаются гены ферментов, инактивирующих антибиотики [25].

Таблица 1 – Характеристика мобильных генетических элементов бактерий, вовлеченных в распространение генов антибиотикоустойчивости в природе

Элемент	**Характеристика**	**Роль в распространении генов**
1	2	3
Коньюгативные плазмиды	Кольцевые, автономно реплицирующиеся генетические элементы, передающие гены между бактериями благодаря коньюгации	Перенос генов резистентности и их мобилизация
Коньюгативные транспозоны	Интегрирующие элементы, которые могут «вырезаться» из хромосомы в виде нереплицирующегося кольцевого производного, способного к конъюгации	Перенос генов резистентности и их мобилизация
Мобилизуемые плазмиды	Носители генов, которые могут переноситься между бактериями благодаря конъюгационному аппарату плазмид	Перенос генов резистентности
Нерепликативные единицы Bacteroides	Интегрированные в геном бактероидов элементы, которые самостоятельно не способны из него «вырезаться» и переносится между бактериями	Перенос генов резистентности

1	2	3
Интегрон	Интегрирующиеся в хромосому бактерии фрагмент ДНК, включающий ген интегразы, промотор и сайт интеграции для генных кассет	Формирование кластеров генов резистентности, находящиеся под контролем прмотора интегрона
Инсерционные криптические последовательности (ISCR-элементы)	Образование комплексных интегронов первого класса	Мобилизация генов, прилегающих к ISCR-элементу
Транспозоны	Могут перемещать фрагмент ДНК из одного участка генома в другой	Перемещение генов антибиотикорезистентности от плазмиды к хромосоме и наоборот
Генные кассеты	Кольцевые нереплицирующиеся ДНК-сегменты, включающие только ORP, интегрируются в интегроны	Включение генов резистентности

Плазмиды и конъюгативные транспозоны являются своеобразной платформой, на которой посредством различных рекомбинационных систем бактериальной клетки происходит сборка и сортировка генов антибиотикорезистентности. В таблице 1 дана характеристика мобильных генетических элементов бактерий, вовлеченных в распространение генов антибиотикорезистентности в природе [67].

Мобильные генетические элементы участвовали в переносе генов резистентности к антибиотикам между бактериями еще до внедрения антибиотиков в клиническую практику [68].

Существует следующий генетический фактор, вызывающий резистентность бактерий, который представляет модификацию собственного генома. Наиболее типичным примером такого механизма являются мутации (аминокислотные замены, делеции, инсерции) в генах, кодирующих мишени действия антибактериальных препаратов, системы эффлюкса, а также пориновые каналы. Резистентность к химиопрепаратам формируется

практически только по этому механизму. В формировании устойчивости к антибиотикам этот механизм имеет меньшее значение [25].

Механизмы резистентности к антибиотикам у бактерий можно классифицировать следующим образом – модификация антибиотиков (детоксикация), уменьшение проницаемости стенки бактерии, структурные изменения в молекулах, продукция бактерией альтернативных мишеней.

Детоксикация заключается в разрушении антибиотика еще до его проникновения в цитоплазму клетку (внешняя среда, периплазматическое пространство грамотрицательных бактерий). При этом мишени антибиотиков в цитоплазме клетки остаются интактными. Осуществляется бактерией с помощью специфических ферментов, расщепляющих антибиотик до структур, не представляющих для нее угрозы.

Следующий механизм устойчивости бактерий – уменьшение проницаемости стенки бактерии для антибиотиков и/или выкачивание его из клетки быстрее, чем антибиотик поразит свои мишени.

Структурные изменения в молекулах, являющихся мишенями для антибиотиков является третьим механизмом бактериальной устойчивости, где проникший в клетку антибиотик не находит свои мишени и не может блокировать биохимические процессы.

Четвертый механизм – продукция бактерией альтернативных мишеней, которые резистентны к ингибирующему действию антибиотика. Они связывают антибиотик и лишают его возможности поразить настоящие мишени. Обычно в качестве ложных целей выступают ферменты [31].

В современной медицинской и ветеринарной практиках можно выделить несколько механизмов резистентности, приводящих к крайне серьезным социально-экономическим последствиям. К таким механизмам можно отнести:

-устойчивость к β-лактамам среди грамположительных и грамотрицательных бактерий, связанная с продукцией β-лактамаз;

-устойчивость к гликопептидам среди *Enterococcus spp.*;

-устойчивость к β-лактамам и ванкомицину среди *Staphylococcus aureus*;

-устойчивость к фторхинолонам среди грамположительных и грамотрицательных бактерий;

- устойчивость к макролидам среди *Streptococcus spp* [53].

В основе резистентности к пенициллинам и цефалоспоринам лежит разрушение пенициллинов обширной группой ферментов, называемых пенициллиназами или β-лактамазами. Эти ферменты разрывают β-лактамные связи в молекулах пенициллинов, приводя к образованию неактивных производных.

Наиболее распространенными среди β-лактамаз являются β-лактамазы ТЕМ-1 и ТЕМ-2, что связывают с локализацией их генов на транспозонах, переносимых между бактериями плазмидами. У грамположительных и грамотрицательных бактерий резистентность к пенициллинам (β-лактамам) осуществляется преимущественно через детоксикацию антибиотика. У хорошо изученной грамположительной бактерии *S. aureus* основная часть синтезируемой β-лактамазы уходит в окружающую среду и там разрушает β-лактамные молекулы.

Фундаментальной причиной, способствующей закреплению в ходе эволюции за грамположительными бактериями устойчивости данного типа к антибиотикам, является отсутствие в их клеточной стенке периплазматического пространства. Уровень антибиотикорезистентности грамположительных бактерий зависит от особенности фермента и того его количества, которое он может позволить себе экспрессировать. β-лактамазы таких бактерий, как правило, имеют высокий аффинитет к β-лактамным антибиотикам.

У грамотрицательных бактерий деструкция β-лактамных антибиотиков осуществляется в периплазматическом пространстве. Поэтому уровень их резистентности зависит от скорости, с которой β-лактамазы проникают в периплазматическое пространство и скорости осуществляемого ферментами

гидролиза. Такие бактерии обычно продуцируют меньшее количество фермента. К тому же, он имеет меньший аффинитет, чем у грамположительных бактерий [42].

Большинство патогенных видов бактерий, встречающихся в стационарах, чувствительно, по меньшей мере, к одному классу β-лактамовых антибиотиков.

Менее известным фактором резистентности бактерий к пенициллинам и цефалоспоринам могут быть мутации в генах пенициллинсвязывающих белков. Они приводят к пониженной аффинности этих белков к β-лактамовым антибиотикам. Помимо аффинности устойчивость бактерий к таким антибиотикам вызывается их пониженным поглощением клеткой из-за изменений в ее оболочке или активного «откачивания» из бактериальной клетки проникшего антибиотика [51].

1.3 Способы определения активности антибактериальных препаратов на бактериальные клетки

1.3.1 Традиционные методы анализа антибактериальной активности препаратов

Определение антимикробной активности антибиотиков, а также потенциальных антимикробных веществ основано на их способности угнетать рост микроорганизмов. Антимикробная активность биологических препаратов выражается в единицах действия ЕД или «мкг». Для большинства антибиотиков 1 ЕД или «мкг» соответствуют 1 мкг активного вещества [20].

На сегодняшний день существуют два микробиологических классических метода определения антибактериальной эффективности антибактериальных препаратов на тот или иной штамм микроорганизма: диффузионный метод и метод серийных разведений.

Методы определения чувствительности антимикробных веществ были

разработаны во второй половине 60-х годов XX века и с тех пор не претерпели принципиальных изменений. Для всех методов общими являются такие этапы, как приготовление и проверка качества питательных сред, приготовление суспензии исследуемых микроорганизмов (инокулюма), инокуляция, инкубирование, учет и интерпретация результатов, и формулировка рекомендаций по лечению. Для диффузионных методов – этап наложения дисков или полосок Е-теста на плотную питательную среду [19].

Используются 2 вида диффузионного метода, один из которых проводится с использованием дисков с антибиотиками, а другой с помощью Е-тестов. Данный анализ проводят методом диффузии в агар на плотной питательной среде путем сравнения размеров зон угнетения роста тест-микробов, образующихся при испытании растворов определенных концентраций Государственного стандартного образца и испытуемого препарата.

Разработанная методика позволяет не только оценивать антибактериальную активность большинства антимикробных препаратов, но и определять устойчивость бактериальных культур к дезинфекционным средствам.

Метод серийных разведений включает в себя разведение в жидкой питательной среде (бульоне) и разведение в агаризованной среде.

Метод диффузных разведений менее чувствителен и менее точен, чем метод серийных разведений, но на практике применяется чаще из-за своей простоты. Скорость диффузии в агар любого препарата зависит от его структуры, молекулярной массы, наличия примесей, состава и pH среды [20].

Данные методы для качественного и количественного анализа эффективности антибактериальных препаратов имеют следующие ограничения: временные затраты, трудоемкость и сложность проведения анализа, к тому же такие тесты имеют достаточно низкую селективность и чувствительность [34].

Современные методы определения чувствительности и резистентности

микробных клеток к антибиотическим препаратам, а также активности самих антибиотических препаратов, несмотря на свои несомненные достоинства, не позволяют быстро и качественно проводить исследования в силу некоторых недостатков, основными из которых является потребность в выделении чистой культуры. Эта процедура занимает от 3 до 10 дней, что не позволяет своевременно начать, а также проводить специфическую и точную оценку анализа влияния антибиотиков на сообщество разных и не конкурирующих штаммов микроорганизмов. Также следует отметить, трудоемкость и малую пропускную способность этих методов.

1.3.2 Альтернативные методы исследования антибактериальной активности препаратов

Анализ активности антибиотиков и других противобактериальных препаратов и веществ включает определение их стабильности и антибактериальной активности к микроорганизмам. Это необходимо для назначения эффективной антибактериальной терапии.

С целью сокращения времени для анализа чувствительности бактерий к антибактериальным препаратам, их ускоренного прогнозирования антибиотикорезистентности, а также определения активности самого препарата, исследователями ведется интенсивная разработка ускоренных методов.

Известны автоматические и полуавтоматические инструментальные способы микробиологического анализа, реализуемые с помощью стационарных приборов, однако они продолжительны по времени и требуют первичного накопления клеток [8].

Например, таким способом является метод лазерной флюоресцентной диагностики (ЛФД), разработанный в научно-производственном центре медицинских и промышленных биотехнологий «Спектролюкс» [23]. Данный метод является экспрессным и позволяет проводить ускоренную оценку

чувствительности бактерий к антимикробным препаратам (антибиотикам, антисептикам). Метод лазерной флюоресцентной диагностики основан на регистрации собственной флюоресценции микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности – порфиринов при возбуждении объекта лазерным излучением [1].

Также исследователями из Санкт-Петербургского государственного электротехнического университета им. В.И. Ульянова (Ленина) рассматривается применение методов лазерного рассеяния света в микробиологическом анализе для экспресс-тестирования микроорганизмов на антибиотикорезистентность. При освещении лазерным светом суспензии живых культур микроорганизмов динамические и статические характеристики рассеянного света взаимосвязаны по форме, размерам и переменным параметрам суспензии, самыми очевидными из которых являются изменение концентрации вследствие деления микроорганизмов и роста численности бактерий, а также уменьшение жизнеспособности и численности вследствие разрушения микроорганизмов под действием антибиотиков. Эти характеристики проявляются как в угловых зависимостях интенсивности рассеяния света, так и в кинетике пространственных флуктуаций интенсивности. Живые бактериальные клетки в суспензиях образуют эффективно рассеивающие излучение гетерогенные среды, что обеспечивает хороший динамический диапазон и чувствительность аналитического метода. В процессе деления микроорганизмов и роста популяции наблюдается увеличение интенсивности рассеянного света, а в результате воздействия антибиотика на суспензию микроорганизмов в жидкой питательной среде, приводящего к прекращению деления, наблюдаются излом и изменение наклона относительно времени и интенсивности рассеянного света [28].

Достижения нано- и микротехнологий в биофизической индустрии открыли возможности создания нового поколения микроаналитических систем «лаборатории на чипе», представляющих собой миниатюрные

гибридные устройства. Разработка таких систем позволяет снизить материало- и энергоемкость изделий, их себестоимость, повысить производительность и интенсивность анализа.

Данный метод анализа на антибиотикочувствительность микробов можно проводить на приборах-анализаторах по мнению исследователей института СпбЛЭТИ микробиологический анализатор «VITEK 2 Compact 60» французской фирмы «bioMerieux», который может осуществлять регистрацию автоматически на отдельных микробиологических карточках для каждого типа анализов. Для работы требуется предварительное накопление и выделение штамма патогенной бактерии. Время анализа составляет, по данным производителя оборудования, до одних суток, а с учетом предварительного накопления патогенных микробных клеток занимает двое и более суток. Этот стационарный и дорогостоящий прибор предназначен в первую очередь для крупных централизованных микробиологических лабораторий. В приборе не автоматизированы предварительное накопление и сортировка микробных клеток с выделением патогенных или диагностически значимых штаммов. Таким образом, этот прибор не может являться достойной заменой классическим методам – диффузии в агар и методу серийных разведений [8].

Другой альтернативный метод исследования эффективности действия антибиотиков был предложен научным центром биомедицинских технологий РАМН (Московская область), который основан на электрооптическом анализе электрофизических свойств бактериальных клеток по изменению оптических свойств суспензии при высокочастотной ориентации в электрическом поле. Измеряемым параметром здесь является анизотропия поляризуемости, которая представляет собой разность продольной и поперечной компонент тензора поляризуемости. Тензор поляризуемости является интегральным параметром, показывающим распределение и величину индуцированных зарядов. Эти заряды клетки меняют при воздействии на них антибиотическими препаратами, причем оптический

эффект является строго видоспецифичным, что позволяет получать подробную количественную информацию – так называемые спектры взаимодействия клетки с АБП. Разработан универсальный электорооптический анализатор клеток ELBIC и различные модификации устройств пробоподготовки и пробоотбора. Программное обеспечение Builder 5.0 решает проблемы, связанные с измерениями, математической обработкой и интерпретацией экспериментальных данных [12]. Проведение мониторинга активности антибиотиков в отношении бактерий с помощью разных модификаций электрооптических анализаторов ELBIC и ELUS, показано в работах [11, 35, 48]. Преимущества данной техники заключается в возможности проведения анализа в режиме реального времени без специальной пробоподготовки.

Научно-исследовательским институтом биомедицинской химии В.Н. Ореховича РАМН совместно с научно-исследовательским институтом эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи были проведены исследования антибиотикорезистентности микроорганизмов электрохимическими методами. Была разработана проточная система «CellSence» с микробными биосенсорами на основе печатных графитовых электродов с иммобилизованными *E. coli*, сигналом которых служит ток восстановления, измеряемый в присутствии медиатора электронного переноса – ферроцианида калия. Однако приведенные системы являются косвенными и нуждаются в присутствии медиатора-посредника для оценки сигнала, что, в свою очередь, может привести к ошибкам измерения и усложняет процедуру проведения экспериментов. Позже была разработана система электроанализа для бактериальных клеток *E. coli* JM109 на печатных графитовых электродах. Чувствительность *E. coli* к ряду антибиотиков была исследована с помощью электрохимических методов (циклвольт-амперометрия, квадратно-волновая вольтамперометрия). К преимуществам данной системы можно отнести применение электродов, полученных методом трафаретной печати, что в свою очередь приводит к

миниатюризации электроанализа, а также к отсутствию вторичных посредников, что сокращает время и упрощает процедуру анализа [33].

Аналитиками из казанского института химии был предложен способ определения тетрациклина, окситетрациклина и доксициклина по электрокаталитическому отклику химически модифицированного электрода с пленкой RuO-RuCN в стационарных и проточно-инжекционных условиях. Линейная зависимость величины каталитического тока от концентрации исследуемых антибиотиков наблюдается от 5 мМ до 0,5 мкМ в стационарных условиях и до 50 нМ в условиях проточно-инжекционного анализа. Использование электрохимического метода привлекает наибольший интерес благодаря скорости, простоте и низкой стоимости, а также проявляют достаточно высокую чувствительность анализа. Несмотря на все свои преимущества, методы вольамперометрический и амперометрический является специфичным и далеко не универсальным методом определения антибактериальной активности антибиотиков. Ко всему прочему данный метод не является идеальным, так как во время электрохимического анализа происходит окисление соединений и адсорбция продуктов окисления на поверхности электрода, что ухудшает метрологические параметры результатов исследования [34].

Еще один из интенсивных методов оценки антибактериальной активности антибиотика к возбудителю был предложен исследователями Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова. Такой экспресс-метод получил название биолюминесцентный. В основу данного метода положено измерение биолюминесценции (свечения), возникающей при взаимодействии аденозин-5-трифосфата (АТФ) с АТФ-реагентом (готовой реакционной смесью, содержащей фермент – люциферазу светляков и люциферин). Интенсивность биолюминесценции пропорциональна концентрации АТФ в реакционной смеси, которая, в свою очередь, пропорциональна титру жизнеспособных микробных клеток в анализируемом образце [32].

Рядом авторов были сделаны первые шаги по привлечению методов атомно-силовой микроскопии в качестве инструмента определения бактерицидного действия антибиотиков в отношении кишечных инфекций [38, 59]. Так, по мнению Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» (г. Саратов), альтернативным методом определения чувствительности бактерий к антибиотикам является атомно-силовая микроскопия (АСМ). Одним из параметров, характеризующих активность цефодизиминов в отношении бактерий, является шероховатость клеточной стенки микроорганизмов. По мнению авторов измерения с помощью АСМ физических показателей – шероховатости клеточной стенки, силы адгезии микроорганизмов к покровному стеклу и разности латеральных сил, в течение короткого промежутка времени (30-60 мин) можно получить информацию о чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам [7].

Все вышеприведенные нетрадиционные методы по изучению эффективности и динамичности антибиотиков и потенциальных антибактериальных веществ являются альтернативными способами и имеют явные преимущества по отношению к классическим микробиологическим методам. Однако организация подобных тестов требует достаточно сложное оборудование и не всегда доступные лабораторные условия, также некоторые из таких анализов, такие как вольтамперометрический и амперометрический являются далеко не надежными. Довольно часто на практике необходимо получить сведения об активности препарата в краткие сроки и во внелабораторных условиях. В этом направлении ведется разработка биосенсорных методов, позволяющих получить результат в течение короткого времени.

Таким образом, учеными и практиками ведется интенсивная работа по разработке новых методов оценки эффективности антибактериальных препаратов в отношении микробных клеток и их популяций с целью

сокращения времени для получения результата, упрощения технологии и снижения затрат на проведение анализа.

1.4 Контроль антибактериальной активности антибиотиков в процессе производства

Для равномерного и непрерывного процесса производства антибиотиков на всех стадиях необходимо подвергать процесс систематическому и целенаправленному аналитическому контролю. С этой целью в контрольно-аналитических лабораториях при производстве проводят предварительный контроль биологических субстанций и вспомогательных веществ, межоперационный контроль как ферментации, химической очистки и контроль выходного препарата.

В процессе производства антибиотиков при контроле качества учитывают такие параметры, как – внешний вид и растворимость, прозрачность и цветность, pH субстанций антибиотиков, определение примесей родственных соединений, содержание влаги или потеря в массе при высушивании, стерильность, бактериальные эндотоксины. Данные виды контроля являются физико-химическими при приемке антимикробных субстанций на производство. Не менее важным показателем при входном контроле таких субстанций является проверка их биологической активности. Для оценки антибактериальных свойств того или иного антибиотика в количественном выражении введено понятие единицы действия (ЕД). ЕД – это активность определенной массы антибиотика, принятого за стандарт. Единицы действия каждого антибиотика указаны в соответствующих фармакопейных статьях.

Для определения биологической активности антибиотических субстанций и готовых антибиотиков в производственных лабораториях применяют методы диффузии в агар или метод серийных разведений

согласно Государственному стандарту и другой нормативной документации [20].

Так при самом производственном этапе биосинтеза сырье антибиотиков контролируется как биологически, так и химически. Большинство питательных субстратов, применяемых в производстве антибиотиков, является веществами растительного или микробного происхождения. Пригодность такого вида сырья определяют путем ферментации в малом объеме. При этом вычисляют выход антибиотика.

Важным фактором для успешного проведения биосинтеза антибиотиков является тщательная проверка качества питательной среды. На каждой стадии выращивания и в ходе самой ферментации необходимо проверить, не произошло ли заражения питательной среды чужеродными микроорганизмами.

Другим важным параметром является соблюдение оптимальных условий ферментации. В ходе проведения ферментации осуществляют микробиологические наблюдение за состоянием продуцента.

При выделении антибиотиков из культуральной жидкости необходимо обращать особое внимание на возможность потерь антибиотика [22].

Полученный готовый антибиотик подвергают химической и биологической проверке по всем показателям, указанным в Государственной фармакопее [20] или в другой нормативно-технической документации.

1.5 Перспективы использования биосенсоров при изучении антибактериальных препаратов

Как уже было указано, довольно часто в практике необходимо получить сведения об активности препарата в краткие сроки и во внелабораторных условиях. Поэтому актуальным является развитие методов для экспресс-анализа активности препарата, в том числе, в процессе его хранения. В этом направлении биосенсорные методы, позволяющие

получить результат в течение короткого времени, представляются достаточно перспективными.

Биосенсоры – компактные аналитические приборы. В таких устройствах процесс формирования комплексов с чувствительным биологическим элементом детектируется и преобразовывается посредством сигнала, который впоследствии может быть обработан, записан и отображен. Биосенсор сочетает три основных компонента: чувствительный биологический объект, трансдьюсер и генератор сигнала [58]. В биосенсорах используются различные механизмы преобразования на основе генерирования сигналов (электрохимического, оптического и др.) или изменения свойств (например, изменения массы) после формирования комплекса. Развитие чувствительных и стабильных биологических элементов – ключевая задача в биосенсорах [57]. Тем не менее, биосенсоры, а иначе их можно назвать в высокой степени, интегрированные компактные устройства, находятся на перекрестке разных областей знаний. Биология и биотехнология лежат в основе ключевого компонента биосенсоров, поскольку чувствительные биологические элементы обеспечивают необходимую специфичность анализа.

Существует два основных принципа анализа эффективности антибактериальных веществ биосенсорными системами. Первый из них заключается в широком использовании иммобилизованных аптамеров в качестве элементов распознавания (так называемых аптасенсоров) [45, 56, 66, 78]. Например, описан процесс подготовки стабильных тонких пленок SiO_2 и процесс иммобилизации тромбин-связывающего аптамера (TBA29 против тромбина) и IgG-антител на их поверхности для диагностики концентраций тромбина (от 4 до 270 нМ). Аптамеры РНК и ДНК – это олигонуклеиновые кислоты, которые связывают интересующий аналит своей 3D-структурой посредством ионного взаимодействия, Ван-дер-Ваальсовых сил или водородных связей, приводящих к обнаруживаемым сигналам. Их чувствительность сравнима с чувствительностью антител. Кроме того, они

могут быть химически синтезированы, обладают высокой термостабильностью и легко модифицируются и иммобилизуются.

Второй принцип антибактериального анализа задается процессами связывания, опосредованными антителами, для чего применяют иммуносенсоры. Такие иммуносенсоры широко используются для антибактериальной диагностики противомикробных препаратов, что продемонстрировано в работах [44, 46, 52, 55, 65, 77].

В отличие от вышеуказанных технических биосенсорных устройств, в ряде исследований также упоминалось «биосенсирование» антибактериальных препаратов с использованием целых бактериальных клеток со специфичным механизмом обнаружения и зондирования определенных антибактериальных препаратов. Один из примеров приведен в работе [75], в которой описано введение *E. coli*, содержащей оперон люциферазы, для контроля тетрациклинов. Микроорганизмы, которые могут быть сохранены в сублимированной форме, производят самобиолюминесценцию после распознавания тетрациклина. Оценка может быть выполнена в формате пластинчатого анализа в качестве необходимой предпосылки для быстрой и недорогой высокопроизводительной системы скрининга. Последующее исследование, в котором сравнивалась емкость бактериального сенсора с микробиологическими анализами ингибирования или LC-MS/MS детекцией тетрациклинов подтвердило ценность и применимость метода [61].

Очень распространенной комбинацией является иммуносенсорное распознавание антибактериальных препаратов с последующим обнаружением на основе SPR–факт, который может быть связан с широким распространением обоих. Конкурентный иммуноанализ в качестве элемента распознавания биосенсоров, например, также был применен исследователями [46] для обнаружения хлорамфеникола в свинине. В другой работе показана [52] возможность иммобилизации производных стрептомицина, проанализировано конкурентное связывание смеси стрептомицина и

антистрептомицина-антитела. Авторами показана возможность количественного анализа стрептомицина и дигидрострептомицина в сельском хозяйстве, а именно меде, молоке и мясе. Исследователи использовали SPR в качестве метода обнаружения SPR, как наиболее распространенный метод обнаружения, также сочетался с распознаванием аптамеров. Аминогликозид неомицин-В был также обнаружен с помощью РНК-аптамера [45].

Возможности акустических датчиков с поверхностной акустической волной для определения уровня d-серина продемонстрированы в работе [47] с использованием инактивированной формы d-сериндегидратазы, иммобилизованной на покрытой пленкой золота поверхности датчика. Процесс связывания между «инактивированной» d-сериндегидратазой и d-серином контролировали путем анализа выходных параметров акустической линии задержки.

В работе [2] изучены условия получения распознающего слоя пьезоэлектрического сенсора на основе многостенных углеродных нанотрубок (УНТ) для высокочувствительного определения фторхинолонов в прямом и конкурентном форматах иммуноанализа.

В работе [26] разработана методика фотохимического синтеза тонких пленок для определения цефалоспоринов, включающая иммобилизацию антибиотиков на модифицированную γ-аминопропилтриэтоксисиланом поверхность электрода пьезоэлектрического сенсора и последующее дозирование неводного раствора метакриловой кислоты, этиленгликольдиметакрилата и 2.2-азобис (изобутиролнитрила) на подготовленную поверхность сенсора. Установлены диапазоны определяемых концентраций антибиотиков (1-26 мкг/см3 для цефтазидима, 1-31 мкг/см3 для цефтриаксона и 1-34 мкг/см3 для цефотаксима).

Описан пьезоэлектрический иммуносенсорный анализ для определения интерферона [73]. В этом случае антитела, специфичные к интерферону, иммобилизовали на электродах.

Изучены условия формирования распознающего слоя пьезоэлектрического сенсора на основе углеродных нанотрубок для высокочувствительного определения рактопамина в прямом формате иммуноанализа. Диапазон определяемых содержаний рактопамина с помощью пьезоэлектрического сенсора составляет (нг/см3) 0.09-25, предел обнаружения 0.03 [26].

Биосенсоры сопоставимы с традиционными методами по чувствительности и специфичности по определению активности антибактериальных веществ и, таким образом, удовлетворяют международным нормативным требованиям. Поскольку биосенсоры предполагают быстрые, простые и экономически эффективные методы анализа, которые можно использовать даже без дополнительной пробоподготовки, они обладают очевидными преимуществами по сравнению с обычными аналитическими методами и поэтому будут иметь большие перспективы для гораздо более широкого применения в ближайшем будущем.

Раздел 2 Объекты, материалы и методы исследования

Экспериментальная и аналитическая работы были выполнены на базе ФГБУН Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (ИБФРМ РАН) и Саратовского филиала Института Радиотехники и Электроники им. В.А. Котельникова РАН.

2.1 Характеристика исходных веществ и материалов

2.1.1 *β*-лактамные антибиотики. Ампициллин

В экспериментальной работе применяли одну из наиболее многочисленных среди всех антибактериальных групп – *β*-лактамные антибиотики. Данный вид антибиотиков является основой современной химиотерапии, так как занимает ведущее место в лечении большинства инфекционных заболеваний. Объем продаж *β*-лактамных антибиотиков в EU составляет 28,8% от общего объема продаж антибиотиков (2-е место после тетрациклинов) [76]. Поэтому необходимость контроля их активности достаточно актуальна.

Активность *β*-лактамных антибиотиков в значительной степени определяется их способностью взаимодействовать с клеточной поверхностью и изменять барьерные свойства цитоплазматической мембраны [36].

К *β*-лактамным антибиотикам, которые объединяет наличие в структуре *β*-лактамного кольца, относятся пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы и монобактамы, обладающие бактерицидным действием. Сходство химической структуры предопределяет одинаковый механизм действия всех *β*-лактамов (нарушение синтеза клеточной стенки бактерий), а также перекрестную аллергию к ним у некоторых пациентов.

Мишенью действия *β*-лактамов в микробной клетке являются ферменты, участвующие в синтезе основного компонента наружной

мембраны микроорганизмов (пептидогликан), связывание *β*-лактамов с ферментами ведет к их инактивации, прекращению роста и последующей гибели микробной клетки.

Пенициллины, цефалоспорины и монобактамы чувствительны к гидролизующему действию особых ферментов - *β*-лактамаз, вырабатываемых рядом бактерий [27].

На практике при выборе антибиотиков руководствовались принципом принадлежности антибактериального препарата к определенной группе, поэтому в работе в качестве антибактериального препарата использовали ампициллин (Sigma, США), как представитель группы *β*-лактамных антибиотиков.

Ампициллин получается ацетилированием 6-аминопенициллановой кислоты аминофенилуксусной кислотой.

Ампициллин – полусинтетический антибиотик группы пенициллинов широкого спектра действия для парентерального и перорального применения. Кислотостабилен. Разрушается пенициллиназой.

В медицинской практике применяют ампициллин, ампициллина натриевую соль, ампициллина тригидрат.

Ампициллин – мелкокристаллический порошок белого цвета, горький на вкус. Мало растворим в воде, практически нерастворим в этаноле, хлороформе, эфире. Молекулярная масса - 349,40.

Ампициллина натриевая соль – порошок или пористая масса белого (или с кремоватым оттенком) цвета, горькая на вкус. Легко растворим в воде, растворим в спирте. Гигроскопична. Молекулярная масса 371,39.

Ампициллина тригидрат – белый кристаллический порошок. Растворим в воде (1:300), практически нерастворим в этаноле.

Данный антибиотик активен в отношении широкого спектра грамположительных (альфа- и бета-гемолитические стрептококки, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus spp.*, *Bacillus anthracis*, *Clostridium spp.*), умеренно активен против большинства энтерококков, в т.ч.

Enterococcus faecalis, *Listeria spp.*, и грамотрицательных микроорганизмов (*Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Proteus mirabilis*, *Yersinia multocida* (*Pasteurella*), *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Bordetella spp.*, *Escherichia coli*), аэробных неспорообразующих бактерий [15].

Поскольку ампициллин активен в отношении грамотрицательных бактерий, в том числе энтеробактерий, в качестве объекта исследования использовали представителя данного семейства – *E. coli*.

Активность ампициллина определяется значительной их способностью взаимодействовать с их клеточной поверхностью и изменять барьерные свойства цитоплазматической мембраны [17, 36].

2.1.2 Адсорбирующие полимерные пленки полистирола

Основные подходы к иммобилизации бактерий состоят из их включения внутрь носителя или их иммобилизации на его поверхности. Адсорбентом могут являться различные вещества, такие как активированный уголь, глина, волокна ацетата целлюлозы и др. К значительным преимуществам полимерных покрытий относятся как удобство их формирования на поверхностях любой формы и размеров, так и переход к композиционным покрытиям путём введения в объём полимера наноразмерных включений.

В работе в качестве носителя при иммобилизации микробных клеток были выбраны пленки полистирола.

Данные полимерные плёнки имеют преимущества, такие как относительно небольшая удельная плотность, необходимый уровень прочности, высокие влагостойкость и сопротивляемость к низким температурам, инертность к агрессивному воздействию кислот и щелочей, а также отличные электроизоляционные и диэлектрические качества.

От таких параметров как шероховатость, смачиваемость, морфология,

наличие на поверхности функциональных групп зависят показатели бактериальной и клеточной адгезии, пролиферации и др.

Полистирольная пленка отличается большой универсальностью. Полистирол является одним из самых дешевых синтетических полимеров, имея при этом следующие немаловажные преимущества: достаточный необходимый уровень прочности; высокая влагостойкость; высокая сопротивляемость к низким температурам; инертность к агрессивному воздействию кислот и щелочей; отличные электроизоляционные и диэлектрические качества.

Полистирол – термопластичный полимер, продукт полимеризации стирола. В зависимости от метода полимеризации получают блочный, суспензионный и эмульсионный полистиролы. Полистирол обладает высокой химической стойкостью и отличными диэлектрическими свойствами, но характеризуется недостаточной термостойкостью и повышенной хрупкостью при действии ударных нагрузок.

Растворяется полистирол в сероуглероде, пиридине, ацетоне, толуоле, дихлорэтане, хлороформе, четырёххлористом углероде, сложных эфирах, медленнее – в бензине. Нерастворим в воде. Термопластичный материал. Полистирол легко формуется и окрашивается, к тому же удачно обрабатывается механическими способами и эффективно склеивается. Ко всему прочему обладает низким влагопоглощением, высокой влагостойкостью и морозостойкостью.

Полистирольные пленки – жёсткие и хрупкие аморфные, данный полимер с высокой степенью оптического светопропускания, невысокой механической прочностью. Полистирол имеет низкую плотность (1060 кг/м^3), данный полимер обладает отличными диэлектрическими свойствами и неплохой стойкостью к низким температурам (до -40 °C) [14].

Одним из эффективных способов управления адсорбционной способностью полистиролов является обработка поверхности пленки в плазме. Плазменная технология стала стандартным элементом инженерии

поверхностей, приводящей к снижению или повышению поверхностного натяжения, обезжириванию металлических частей и полимеризации пленок с заданными свойствами. При этом поверхностная плазменная модификация является уникальным инструментом, который позволяет избирательно улучшать поверхностные свойства материала, не затрагивая его объёмных свойств, и обеспечивать биосовместимость плёнок и увеличение их адсорбционных свойств [54, 62, 63, 69, 74].

2.2 Характеристика биологического объекта – *Escherichia coli* XL-1 Blue

В работе использовали культуры *Escherichia coli* (*E. coli*) XL-1 Blue (IBPPM 632), полученные из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (Саратов) [43].

Домен: Бактерии

Тип: Протеобактерии

Класс: Гамма-протеобактерии

Порядок: *Enterobacterales*

Семейство: Энтеробактерии

Род: *Escherichia*

Вид: *Escherichia coli*

Штамм*: Escherichia coli* XL-1

E. coli представляют собой полиморфные прямые или слегка изогнутые палочки с закругленными концами средних размеров (длина 2-6 мкм и ширина 0,4-0,6 мкм). Палочки располагаются одиночно, реже – попарно. Спор не образуют. *E. coli* являются аэробами или факультативными анаэробами.

Клетки *E. coli* имеют пили (фимбрии) и обладают подвижностью благодаря перитрихиально расположенным жгутикам (Рисунок 1).

Оптимальная температура роста *E. coli* составляет 35-37ºС. Хорошо растет на простых питательных средах. На мясопептонном агаре (МПА) *E. coli* образуют колонии средних размеров, серо-белые, гладкие, влажные, блестящие, с ровными краями (S-форма). В жидких средах вызывают равномерное помутнение, иногда образуют незначительный осадок [16].

По методу Грама *E. coli* окрашиваются грамотрицательно. *E. coli* обладают хорошей биохимической активностью, они ферментируют и образуют из кислоты и газа глюкозу, лактозу, мальтозу, арабинозу, галактозу, маннит [18].

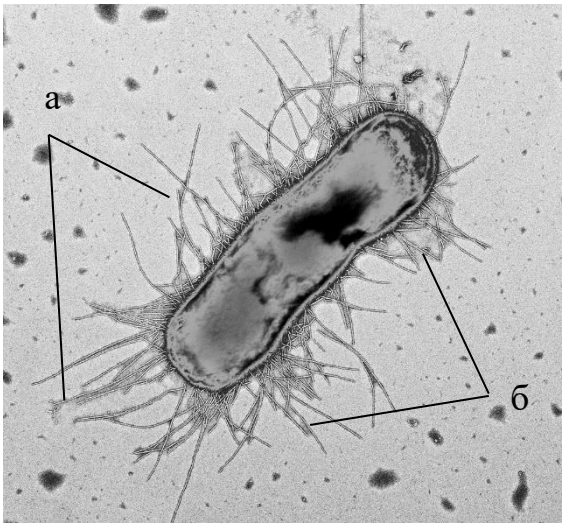

Рисунок 1 – Электронная микрофотография клетки *E. coli* XL-1: а) жгутики и б) пили.

Характерным признаком *E. coli* является ферментация лактозы. По способности ферментировать лактозу различают лактозоположительные и лактозоотрицательные кишечные палочки. В качестве дифференциально-диагностических сред при выделении кишечной палочки используют среды, содержащие лактозу (среды Эндо, Левина, Плоскирева).

В окружающей среде *E. coli* достаточно устойчивы. При 60 ºС они погибают в течение 15 минут, при 100ºС – моментально. В воде, почве сохраняют жизнеспособность месяцами. В молоке сохраняют жизнеспособность более 30 суток, в детских питательных смесях – более 3 месяцев, на игрушках и предметах обихода – до 3-5 месяцев. Прямой

солнечный свет вызывает гибель *E. coli* через несколько минут. *E. coli* чувствительны к большинству дезинфицирующих веществ (формальдегиду, препаратам хлора, гидроксиду натрия и др.) и антибиотиков (тетрациклинам, аминогликозидам, рифампицину и др.). Однако они способны быстро приобретать устойчивость к антимикробным препаратам в основном за счет приобретения R-плазмид.

E. coli содержат соматический О-антиген, капсульный К-антиген и жгутиковый Н-антиген. Эти антигены являются основой серологической классификации эшерихий.

Соматический О-антиген (липополисахаридно-протеиновый комплекс) определяет серологическую группу эшерихий. В настоящее время по О-антигену выделяют 173 варианта (серовара) кишечной палочки. Для серологической типизации *E. coli* промышленностью выпускаются диагностические О-сыворотки. О-антиген не разрушается при нагревании до 100 ºС в течение 2,5 часов. Белковый компонент обусловливает иммуногенные свойства, липидный – токсичность, полисахаридный – серологическую специфичность *E. coli*.

Капсульный К-антиген представлен мукополисахаридами. У *E. coli* обнаружено 97 разновидностей К-антигена. К-антиген подразделяется на разновидности (А, В и L), которые различаются физическими свойствами – чувствительности к температуре и химическим соединениям. По расположению К-антиген находится на поверхности клеток, поэтому может препятствовать агглютинации бактериальных клеток О-сыворотками.

Жгутиковый Н-антиген (белок флагеллин) обладает типовой специфичностью. *E. coli* имеют 57 разновидностей Н-антигена.

Количество возможных комбинаций О-, К- и Н-антигенов превышает 2000. Антигенная структура *E. coli* представляет собой формулу, в которой указываются буквенные и цифровые обозначения антигенов, разделенные двоеточием, например, О101:К5:Н10 [16].

2.3 Методики исследования

2.3.1 Культивирование бактериальных клеток

В экспериментальной работе использовали культуры *Escherichia coli* XL-1 Blue (IBPPM 632), полученные из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (Саратов) [43].

Для культивирования бактериальных клеток использовали стандартные среды – 2xTY и LB среды. Состав питательной среда 2xTY: NaCl, 5 г/л; дрожжевой экстракт (DIFCO, США), 10 г/л; триптон (Becton, Dickinson and Company, США, Франция) 5 г/л. Состав питательной среды LB составил (г/л): NaCl , 5 г/л; дрожжевой экстракт (DIFCO, США), 10 г/л; пептон (Becton, Dickinson and Company, США, Франция), 5 г/л, - жидкая и плотная.

E. coli XL-1 Blue выращивали на жидкой питательной среде 2xTY или LB при 30 °C в течение 18-20 ч, как описано [46]. Культивирование бактерий проводили в аэробных условиях на круговой качалке (160 об/мин) при постоянной температуре 30 ºC в течение 18 ч.

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ)

Подготовку препаратов для электронно-микроскопических снимков проводилась, как описано в работе [72] при помощи просвечивающего электронного микроскопа Libra 120 («CarlZeiss», Германия) при ускоряющем напряжении 120 кВ в Центре коллективного пользования научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии «Симбиоз» ИБФРМ РАН.

2.3.2 Формирование и модификация пленок полистирола плазменным травлением с помощью ВЧ разряда

Плёнки полистирола (ПС) получали методом центрифугирования. В качестве подложек использовали пластины монокристаллического кремния размером 10×10 мм2. Гранулированный ПС растворяли в четырёххлористом углероде (CCl_4, 96 масс. %). Затем полученную смесь методом центрифугирования наносили на подложки в герметичной камере в атмосфере насыщенных паров растворителя. Скорость вращения подложки составляла 2000 об/мин. Толщина полученных плёнок оценивалась по ее сколу образцов методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) и составляла 280±20 нм. Модификацию поверхности плёнок ПС осуществляли в вакуумной камере установки Orion-40T («VTC», Южная Корея). Подложки с нанесенной пленкой ПС располагали в зоне эрозии мишени магнетрона. Высокочастотный разряд (13.56 МГц) зажигался в атмосфере аргона. Мощность разряда составляла 100 Вт, рабочее давление в камере поддерживалось на уровне 10-3 мбар. Обработка пленок ПС осуществлялась в течение 10, 20 и 30 с. Подробные результаты изучения влияния времени плазменной обработки на морфологию и структуру поверхности плёнок ПС приведены в работе [69]. Морфология образцов полимерных покрытий изучалась при помощи СЭМ Mira II («Tescan», Чехия). Подготовка пленок ПС проводилась совместно с сотрудниками кафедры материаловедения технологии и управления качеством Саратовского государственного университета (СГУ) им. Н.Г. Чернышевского.

2.3.3 Иммобилизация микробных клеток на модифицированных пленках

В качестве носителя при иммобилизации микробных клеток были выбраны пленки ПС. Целью данного этапа работы являлась иммобилизация

бактериальных клеток на поверхности пленок ПС, модифицированных плазменной обработкой, и оценка времени сохранения жизнеспособности бактерий.

Для улучшения адсорбционных свойств пленок ПС проводилась их обработка в плазме ВЧ разряда в течение 10, 20 и 30 с.

Перед иммобилизацией проверяли оптическую плотность суспензии клеток. Для адсорбции ПС помещали в среду с клетками так, чтобы она полностью была покрыта суспензией, и инкубировали при интенсивной аэрации в течение 20 мин при температуре 35 °С. Процент адсорбированных микробных клеток определяли по разнице их содержания в супернатанте до и после инкубации с носителем (процент иммобилизации клеток на носителе). Таким способом рассчитывалось оседание (или иммобилизация) микробных клеток на носителе. Данный вариант расчета не исключал ошибки при определении абсолютных величин сорбции, но воспроизводимость результатов свидетельствовала об их достоверности.

После иммобилизации микробных клеток поверхность ПС изучали методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) с помощью зондовой нанолаборатории NtegraSpectra («NT-MDT», Россия). Изображения поверхности ПС получали в полуконтактном режиме с помощью кремниевого зонда NSG-10. Область сканирования составляла 5×5 мкм (25 мкм^2). Обработку изображений проводили с помощью программного комплекса Gwyddion. АСМ проводилась совместно с сотрудниками кафедры материаловедения технологии и управления качеством СГУ им. Н.Г. Чернышевского.

После модификации пленок ПС плазменным травлением проводили оптимизацию условий иммобилизации микробных клеток *E. coli* XL-1, которая включала подбор оптимальной микробной нагрузки, pH раствора, в котором проходила иммобилизация, и температуры.

2.3.4 Регистрация биологических взаимодействий при помощи СВЧ резонатора

Детектирующая система на основе сверхвысокочастотного (СВЧ) резонатора была разработана в Саратовском филиале ИРЭ им. В.А. Котельникова (г. Саратов). Схема детектирующей системы подробно описана в работе [70] и представлена на рисунке 2.

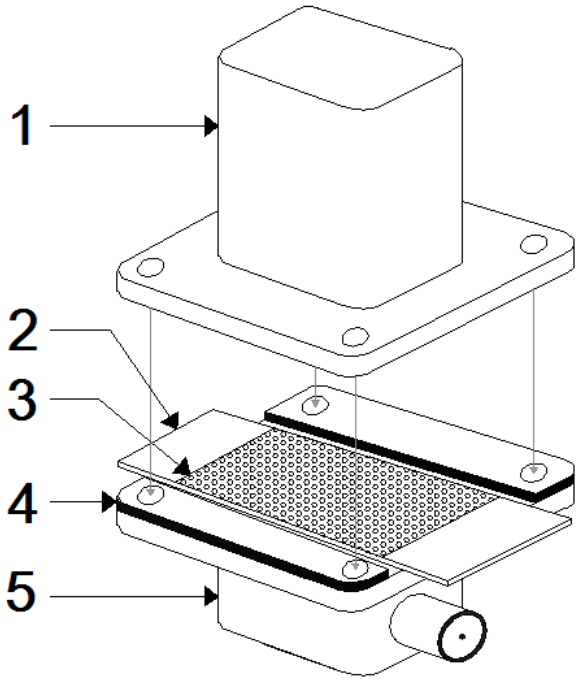

Рисунок 2 – Схема детектирующей системы на основе СВЧ резонатора:
1 - отрезок волноводного тракта, 2 - пластина ниобата лития;
3 - чувствительный слой, 4 - направляющие для точной ориентации пластины ниобата лития; 5 - коаксиально-волноводный переход

Чувствительный слой датчика представлял собой тонкую плёнку ПС, которая равномерно наносилась на поверхность пластины ниобата лития и модифицировалась в плазме высокочастотного (ВЧ) разряда аргона. Данное устройство с помощью коаксильно-волноводного перехода и коаксиального кабеля подключалось ко входу измерителя S-параметров («Agilent», США). Коэффициент отражения S11 измерялся в диапазоне частот 5-8,5 ГГц. Эксперименты с использованием СВЧ резонатора проводили совместно с

сотрудниками Саратовского филиала Института радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова.

Достоверность полученных результатов определяется с использованием новейшей аппаратуры (LCR-meter Agilent 4285A (США), базовая погрешность прибора составляла не более чем 2%.

Для статистической обработки экспериментальных данных также использовали пакет прикладных программ Microsoft Excel 2000.

Все эксперименты проводились не менее чем пять раз. Относительная погрешность результатов измерений исследуемых образцов составляла ± 2%. То есть при проведении нескольких экспериментов с одним и тем же воздействием антибиотика на иммобилизованные микробные клетки разброс регистрируемых значений находился в пределах ± 2%.

Раздел 3 Результаты исследований и их анализ

3.1 Результаты атомно-силовой микроскопии иммобилизованных бактериальных клеток

При разработке биосенсорных систем, содержащих клетки микроорганизмов, активно используется их иммобилизация. Развитие методов иммобилизации бактерий и поиск оптимального носителя лимитирует создание новых сенсоров. Иммобилизованные клетки называются «иммобилизованные биокатализаторы» (в соответствии с номенклатурой Европейской федерации по биотехнологии) [39].

Основные подходы к иммобилизации клеток состоят из их включения внутрь носителя или их иммобилизации на его поверхности. Адсорбционные методы иммобилизации относятся к числу наиболее простых и "естественных", которые, как правило, слабо влияют на ферментативную систему клеток [9].

Адсорбентом могут являться различные вещества, такие как активированный уголь, глина, волокна ацетата целлюлозы и др. Наиболее широко для иммобилизации используются следующие электропроводящие полимеры: полианилин, полипиррол, политиофен и другие [37].

Немаловажным критерием при выборе носителя является возможность его повторного использования, что приводит к поиску дешевых и потенциально доступных материалов [64]. Возможности применения органических и неорганических носителей для иммобилизации микробных клеток продемонстрированы в ряде работ [4, 40, 64, 71].

К значительным преимуществам полимерных покрытий относятся как удобство их формирования на поверхностях любой формы и размеров, так и переход к композиционным покрытиям путём введения в объём полимера наноразмерных включений. Полимерные плёнки, в том числе и плёнки

полистирола (ПС), находят широкое применение в различных областях медицины, нано- и биотехнологии, а также сенсорных технологиях [49, 60].

В качестве носителя для иммобилизации микробных клеток были выбраны пленки ПС. Для улучшения адсорбционных свойств пленок ПС проводилась их обработка в плазме ВЧ разряда в течение 10, 20 и 30 с.

Как видно из рисунка 3 (а), морфология необработанной пленки полистирола выглядит относительно гладкой. Однако обработка в плазме ВЧ плёнок ПС приводит к изменению морфологии их поверхности (Рисунок 3 (б-г)).

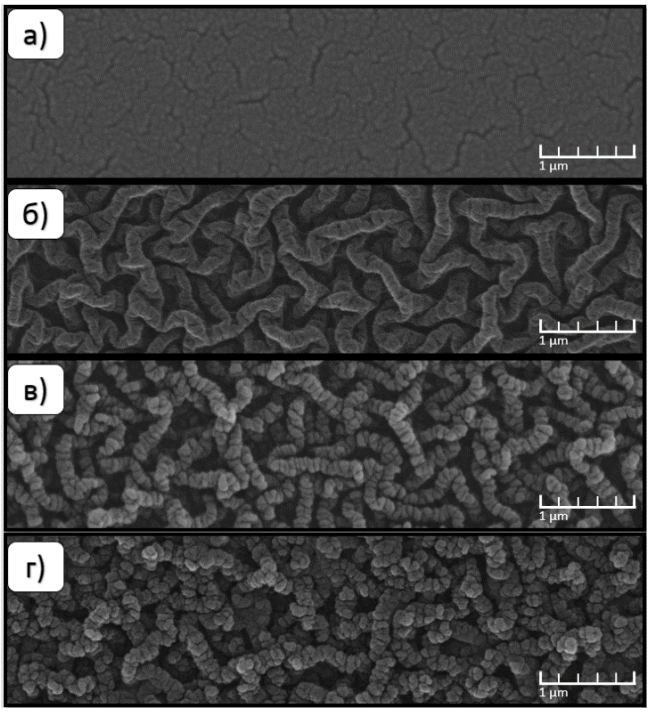

Рисунок 3 – АСМ-изображение поверхности плёнки полистирола до (а) и после обработки плазмой в течение 10 (б), 20 (в) и 30 с (г)

Травление в плазме ВЧ разряда в течение 10 с приводит к образованию на поверхности пороговой формы и размеров (Рисунок 3 (б)). Поверхность образца представлена стержнями неправильной формы с диаметром и длиной – 0.21 и 1.8 мкм соответственно. 20-ти секундная обработка приводит к уменьшению скорости стержня до 0.19 мкм, на рисунке 3 (в) отчётливо видно, что стержень представляет собой микродоменную структуру, состоящую из последовательно соединенных частиц неправильной формы. Данные частицы представляют собой полимерные цепи, свёрнутые в клубки-

глобулы. Полимерные глобулы имеют разный размер из-за разной длины полимерных цепей. Дальнейшая плазменная обработка образцов полимерных плёнок в течение 30 с уменьшает глубину пор (рисунок 3 (г)).

После модификации пленок ПС плазменным травлением проводили оптимизацию условий иммобилизации микробных клеток *E. coli* XL-1, которая включала подбор оптимальной микробной нагрузки для данного исследуемого штамма, pH раствора, в котором проходила иммобилизация, и температуры.

3.2 Результаты оценки жизнеспособности бактерий, иммобилизованных на ПС

Было изучено влияние различного времени обработки пленок в плазме (10, 20 и 30 с) на эффективность иммобилизации биологических объектов на примере микробных клеток *E. coli* XL-1. Оказалось, что оптимальное время обработки в плазме составляло 30 с, при этом на поверхности пленок было зафиксировано наибольшее количество микробных клеток. Были выбраны оптимальные условия адсорбции микробных клеток на пленках ПС. Так, время иммобилизации клеток составило 15-20 мин, значение pH среды инкубации – 7.0-7.2 и количество клеток в исходной суспензии (микробная нагрузка) ~ 1.30-1.42 г сухого веса клеток/л. Использование высокого содержания клеток оказалось нецелесообразным, поскольку при этом уменьшалось количество клеток, адсорбировавшихся на носителе, а оставшихся в свободном состоянии – увеличилось. Иммобилизацию клеток проводили в дистиллированной воде (электропроводность 1.8-2.2 мкСм/см). Определение количества микробных клеток осуществляли при 25-27 °С.

На рисунке 4 представлены ПЭМ-изображения микробных клеток использованных штаммов до иммобилизации.

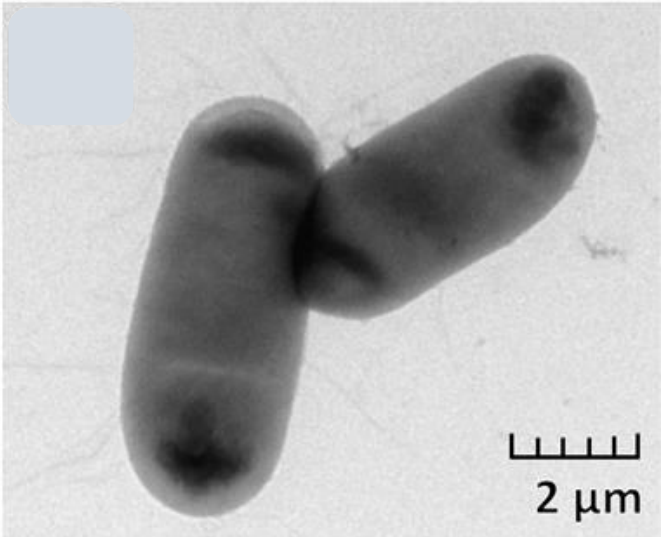

Рисунок 4 – ПЭМ-изображение свободных клеток *E. coli* XL-1 (× 10,000)

На рисунке 5 представлено АСМ-изображение поверхности полимерной пленки с иммобилизованными клетками *E. coli* XL-1.

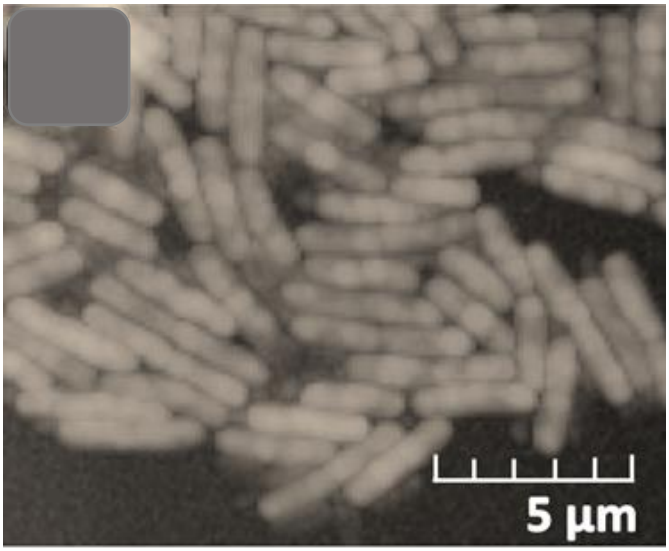

Рисунок 5 – АСМ-изображение поверхности плёнки полистирола с иммобилизованными на поверхности клетками *E. coli* XL-1

Как правило, иммобилизованные клетки сохраняют пролиферативную функцию как после иммобилизации, так и после длительного использования в биотехнологических процессах. При этом кинетические характеристики роста (удельная скорость роста и время удвоения) иммобилизованных клеток

существенно не отличаются от аналогичных характеристик свободных клеток [13, 79].

Жизнеспособность микроорганизмов определяется, прежде всего, способностью клеток к делению. После иммобилизации бактерий на поверхности пленок ПС проводили микробиологическую оценку их жизнеспособности. Определяли наличие зон роста клеток после внесения полученного биосорбента с клетками в чашку Петри с плотной питательной средой LB (наличие роста клеток), как показано на рисунке 6 (а). В качестве контроля использовали пленки ПС без предварительной иммобилизации на них клеток (отсутствие роста), которые вносили в твердую питательную среду LB (рисунок 6 (б)).

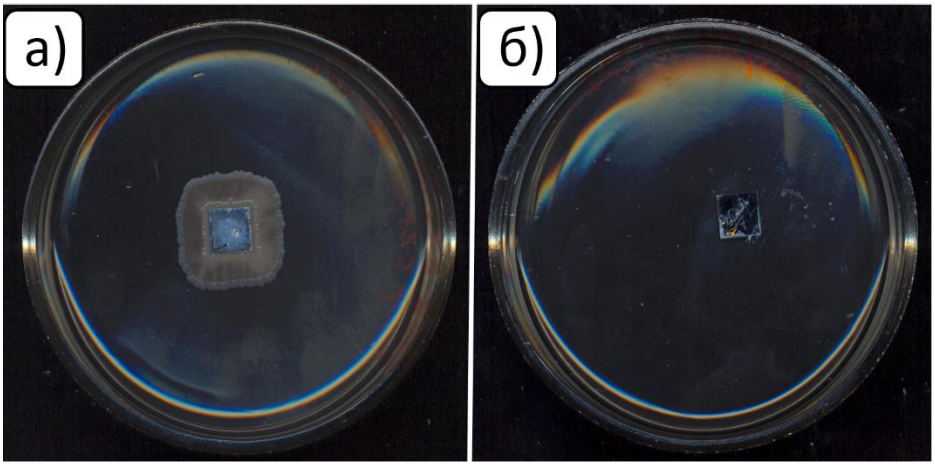

Рисунок 6 – Пленки ПС с иммобилизованными на их поверхности клетками (а) и без них (б) на твердой питательной среде LB в чашках Петри

Далее каждые 14 суток определяли время сохранения жизнеспособности биокатализаторов на основе *E. coli* XL-1 в процессе их хранения при 4 °С.

Полученный биокатализатор, содержащий иммобилизованные клетки, в некоторых случаях сохранял активность при 4 °С в течение 6 мес. хранения, результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты определения жизнеспособности бактерий

Микробные клетки	Время отработки носителя	Оценка жизнеспособности через 1-6 мес.												
		После иммоби-лизации	1		2		3		4		5		6	
E. coli XL-1	Без обработки	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	20	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

Примечание. * «+»/«-» – наличие/отсутствие роста клеток.

Предполагается, что носитель играет роль защитного барьера для иммобилизованных клеток, «экранируя» их от негативного воздействия метаболитов и препятствуя их проникновению в матрицу.

Согласно результатам, полученным в работе [13], матрица носителя не является препятствием для проникновения в клетки даже таких высокомолекулярных соединений, как ДНК. Можно предположить, что одной из возможных причин долговременной сохранности активности микробного биокатализатора является капиллярная конденсация паров воды из окружающей среды в порах модифицированных ПС покрытий при их хранении. Было установлено [10, 69], что понижая температуру хранения микробного биокатализатора можно создать условия для капиллярной конденсации влаги в порах ПС пленки, модифицированной плазменным травлением. Конденсированная в порах полимерных матриц влага может способствовать жизнеспособности иммобилизованных на ее поверхности биологических объектов (бактерий) и сохранение их активности до 6 мес.

Результативность работы биокатализатора на основе микробных клеток во многом определяется эффективностью снабжения иммобилизованных бактерий питательными веществами или субстратами, а также легкостью

отвода метаболитов. Эти факторы зависят, главным образом, от диффузионных барьеров, создаваемых материалом носителя [9]. В основе интенсификации жизнедеятельности иммобилизованных бактерий лежат специфичные условия, возникающие на поверхности раздела фаз «жидкость-твердая поверхность». Можно предположить, что граница раздела жидкости и твердого тела служит микросредой, в которой клеткам легче изменить условия своей жизнедеятельности в благоприятную для себя сторону. Иммобилизованные биокатализаторы должны быть применимы в достаточно широких диапазонах температур, значений pH и давлений.

Проведенное на примере *E. coli* XL-1 изучение показало перспективность использования пленок ПС в качестве иммобилизующего агента с возможностью многократного использования. Преимущества данного носителя – простота иммобилизации (путем адсорбции) и короткое время для получения биокатализатора (~30 мин), при этом процесс обработки ПС в плазме составлял ~30 с, а микробные клетки после иммобилизации сохраняли жизнеспособность до 6 мес.

Полученные результаты представляют интерес с практической точки зрения для применения полимерных покрытий, модифицированных плазменным травлением, в качестве носителя для иммобилизации клеток при создании биосенсоров.

3.3 Показатели антибактериальной активности ампициллина с помощью СВЧ резонатора

Активность β-лактамных антибиотиков в значительной степени определяется их способностью взаимодействовать с клеточной поверхностью и изменять барьерные свойства цитоплазматической мембраны [6]. Ампициллин активен в отношении ряда грамотрицательных палочек, поэтому в качестве модельного объекта исследования использовали *E. coli* штамма XL-1. Ранее было показано, что клетки данного штамма являются

чувствительными к ампициллину.

Целью данного этапа работы является оценка воздействия ампициллина на микробные клетки, иммобилизованные на пленках ПС, с помощью датчика на основе электродинамического СВЧ резонатора для определения антибактериальной активности препарата. Общая схема проведения экспериментов представлена на рисунке 7.

Рисунок 7 – Общая схема проведения экспериментов с использованием датчика на основе СВЧ резонатора

Возможности использования микробных клеток, иммобилизованных на пленках ПС, модифицированных плазменным травлением, продемонстрированы в биосенсорной детектирующей системе на основе сверхвысокочастотного (СВЧ) резонатора (5-8,5 ГГц). Для этого с помощью коаксиально-волноводного перехода электродинамический СВЧ резонатор подключался к измерителю S параметров E5071C и измерялась зависимость

коэффициента отражения S11 от частоты в диапазоне 5.5-8.5 ГГц. Эта зависимость для модифицированной плёнки ПС, не содержащей иммобилизованных микробных клеток, представлена на рисунке 8.

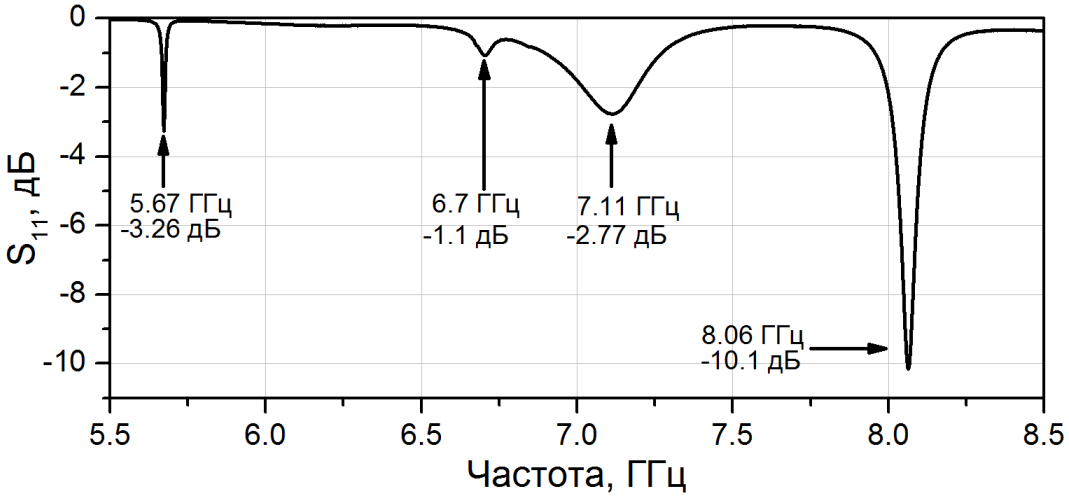

Рисунок 8 – Частотная зависимость коэффициента отражения S11 для резонатора с модифицированной в плазме плёнкой ПС, не содержащей микробные клетки

Видно, что в указанном диапазоне наблюдались три ярко выраженных минимума, соответствующих резонансным частотам 5.67, 7.11 и 8.06 ГГц. Теоретический анализ показал, что для этих резонансов вдоль резонатора укладывается в волноводе одна, две и три половины длины волны, соответственно.

Третий резонанс (на частоте 8.06 ГГц) характеризовался наименьшим коэффициентом отражения (-10.1 дБ по мощности или 0.31 по амплитуде). В этом случае коэффициент стоячей волны (КСВ≈2), оказался наименьшим из всех трех резонансов. Это означало, что изменение электрических граничных условий в плоскости, где находится пластинка ниобата лития, в этом случае будет сильнее влиять на параметры резонатора по сравнению с другими резонансами. В связи с этим дальнейшее изучение влияния иммобилизованных бактериальных клеток и биологических взаимодействий на пленке ПС проводили именно для этого резонанса.

На рисунке 9 представлена частотная зависимость коэффициента отражения S_{11} для резонатора с немодифицированной (*0*) и обработанной в плазме плёнкой полистирола, содержащей микробные клетки, после иммобилизации в течение 10 (*1*), 20 (*2*), 30 (*3*) и 40 (*4*) мин.

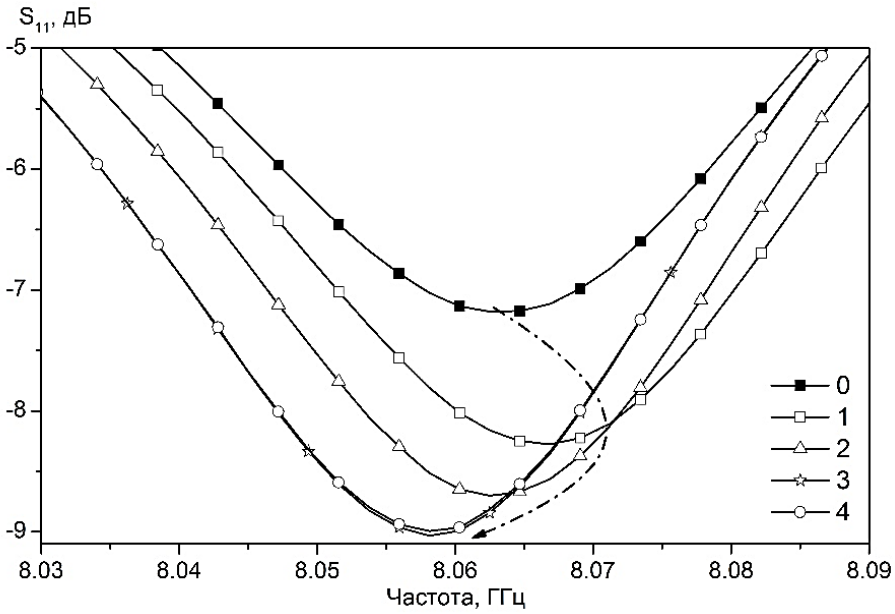

Рисунок 9 – Частотная зависимость коэффициента отражения S_{11} для резонатора с немодифицированной (0) и обработанной в плазме плёнкой полистирола, содержащей микробные клетки после разного времени иммобилизации: в течение 10 (*1*), 20 (*2*), 30 (*3*) и 40 (*4*) мин

На рисунке 10 представлена зависимость коэффициента отражения S_{11} на резонансной частоте от времени иммобилизации бактериальных клеток. Видно, что с увеличением времени иммобилизации от 10 мин до 30 мин коэффициент отражения S_{11} вблизи третьего резонансного пика увеличивается по абсолютной величине от 8.27 до 9 дБ. При этом частота пика уменьшилась от 8.0027 до 8.029 ГГц.

Дальнейшее увеличение времени иммобилизации (более 30 мин) не приводило к каким-либо изменениям. Исходя из полученных данных, время для иммобилизации клеток составляло 20 мин.

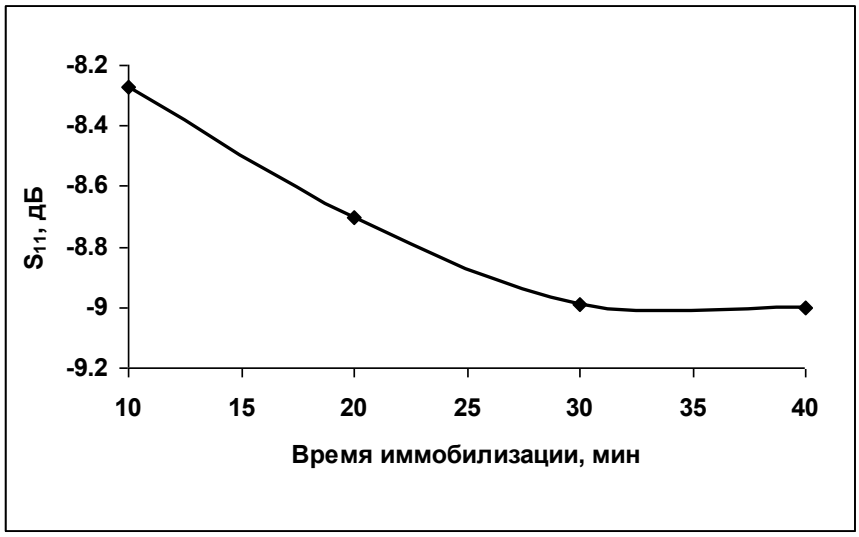

Рисунок 10 – Зависимость коэффициента отражения S_{11} на резонансной частоте от времени иммобилизации бактериальных клеток

Далее к иммобилизованным клеткам добавляли антибиотик (5, 10, 25 и 50 мкг/мл) и определяли частотную зависимость параметра S_{11} вблизи третьего резонансного пика, как показано на рисунке 11. Выбор концентраций антибиотика был обусловлен ранее проведенными исследованиями [21].

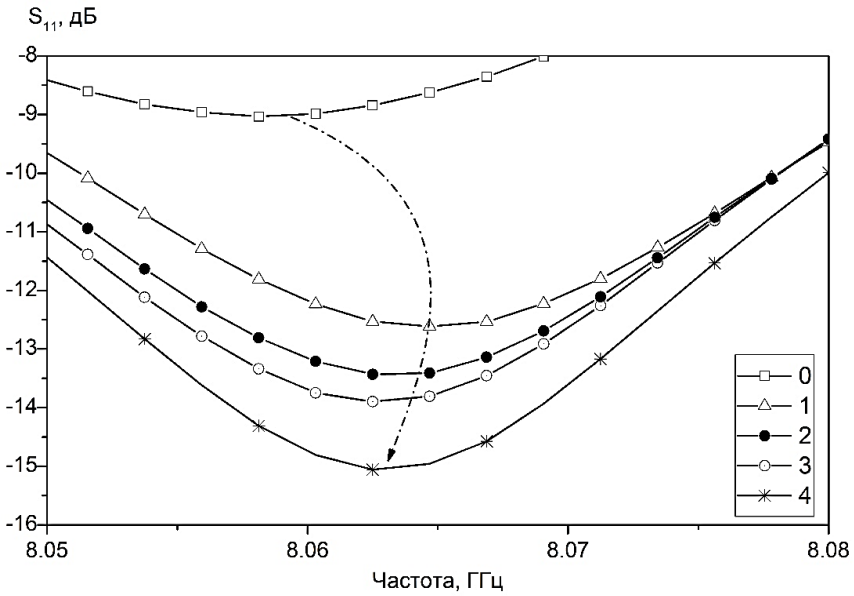

Рисунок 11 – Частотная зависимость коэффициента отражения S11 для резонатора после иммобилизации клеток (0), а также после внесения разных концентраций антибиотика: 5 (*1*), 10 (*2*), 25 (*3*) и 50 (*4*) мкг/мл)

На рисунке 12 представлена зависимость коэффициента отражения S_{11} на резонансной частоте от концентрации добавляемого антибактериального препарата.

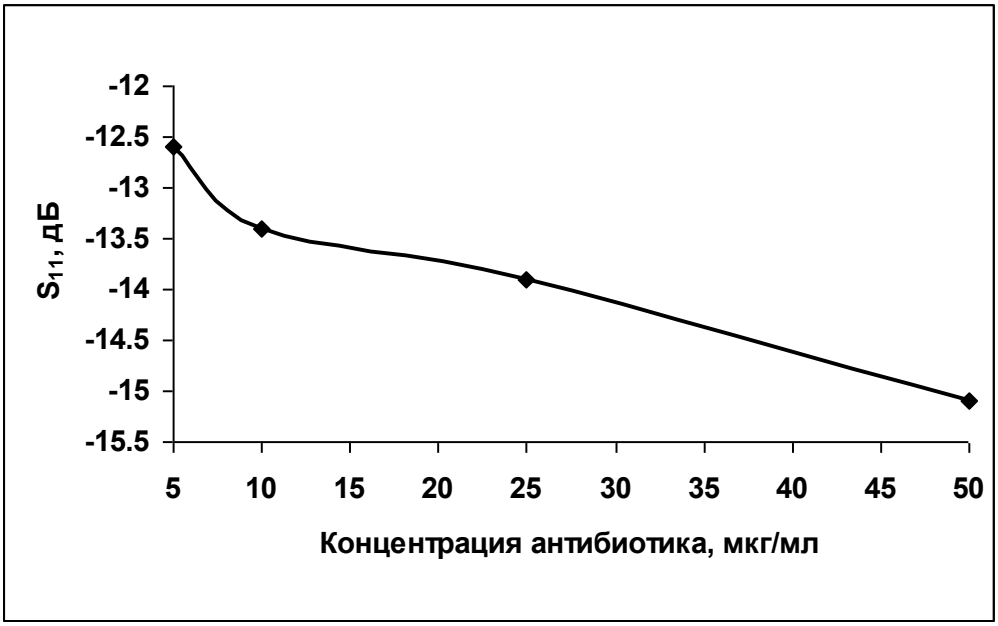

Рисунок 12 – Зависимость коэффициента отражения S_{11} на резонансной частоте от концентрации добавляемого антибиотика

Из рисунков 11 и 12 видно, что при увеличении количества антибиотика от 5 до 50 мкг/мл величина S_{11} изменяется от -12.6 до -15.1 дБ. При этом во всех случаях резонансная частота менялась в небольших пределах: 8.065-8.062 ГГц. Поскольку изменение величины S_{11} зависит от концентрации антибиотика, полученные данные могут быть использованы для определения концентраций ампициллина в водных растворах.

Была изучена динамика изменения коэффициента отражения от пленки полистирола с иммобилизованными клетками при воздействии ампициллина в течение 10, 15 и 20 мин. На рисунке 13 представлена частотная зависимость коэффициента отражения S_{11} для резонатора после иммобилизации клеток (0), а также после воздействия антибиотика (10 мкг/мл) в течение (1)-10, (2)-15, (3)-20 мин.

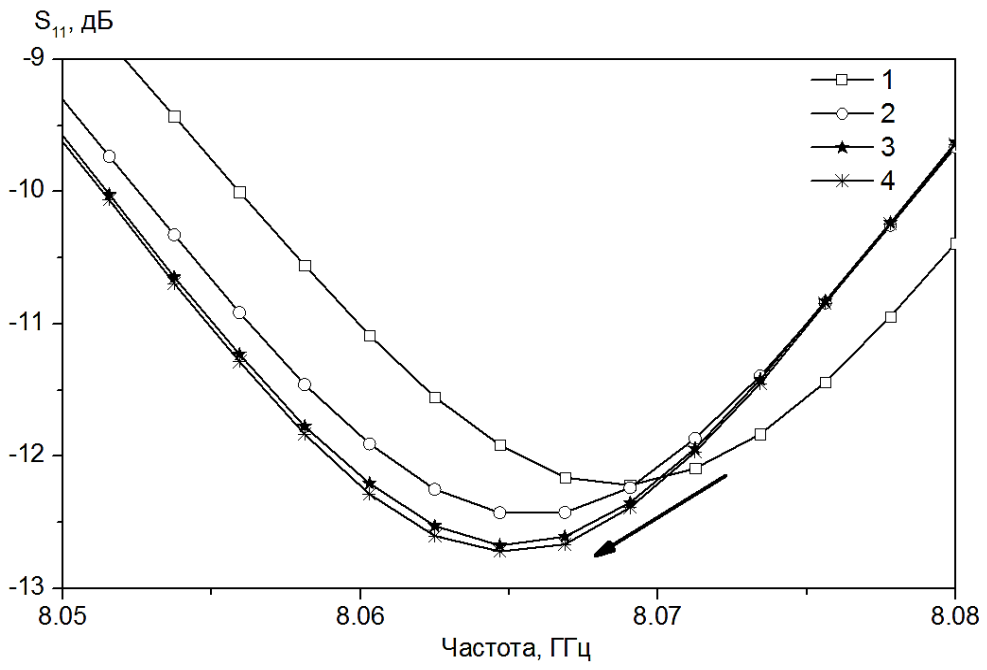

Рисунок 13 – Частотная зависимость коэффициента отражения S11 для резонатора после иммобилизации клеток (*1*), а также после воздействия антибиотика в течение (*2*)-10, (*3*)-15, (*4*)-20 мин

Зависимость этого коэффициента на резонансной частоте от времени воздействия показана на рисунке 14. Видно, что S_{11} увеличивается по абсолютной величине и, начиная с 15 мин, стремится к насыщению. При этом частота пика 8.065 ГГц остается неизменной. Дальнейшее увеличение времени взаимодействия не приводило к изменению наблюдаемой частотной зависимости параметра S_{11}.

Таким образом, воздействие антибиотика приводит к существенному изменению значения коэффициента отражения S_{11} на резонансной частоте при времени воздействия 15-20 мин. Это означает, что с помощью микробного датчика на основе электродинамического СВЧ резонатора возможно провести оценку активности антибиотика в исследуемом диапазоне концентраций при времени анализа ~ 15 мин.

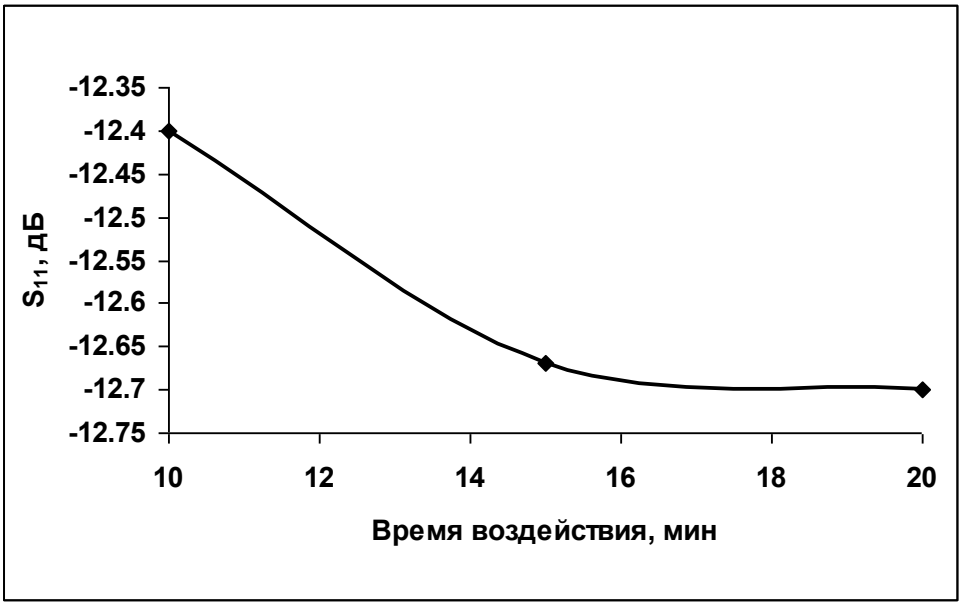

Рисунок 14 – Зависимость коэффициента отражения S_{11} на резонансной частоте от времени воздействия антибиотика

Заключение

Быстрое распространение разнообразных механизмов резистентности микроорганизмов ставит перед клинической медициной и фундаментальной биологией серьезные вопросы, решением которых могут являться совершенствование средств диагностики устойчивости бактерий, а, следовательно, разработка более чувствительных методов анализа биологической активности антибактериальных препаратов. В связи с этим нами была предложена и продемонстрирована возможность определения активности антибактериальных препаратов (на примере ампициллина) в отношении микробных клеток.

В работе показана возможность иммобилизации микробных клеток *E. coli* методом адсорбции на полистироле (ПС носителе) и оптимизированы условия проведения теста при анализе ампициллина с помощью сенсорной системы на основе электродинамического СВЧ резонатора. Разработанная система может быть использована для определения активности образцов антибактериального препарата на всех стадиях производства антибиотиков и для определения стабильности антибиотиков в процессе их хранения. Вопрос сохранения активности препаратов возникает не только при непосредственном применении антибиотика в качестве лекарственного препарата, но и в процессе их хранения, а также при производстве антибиотиков. Поскольку изменение величины S_{11} зависит от концентрации антибиотика, полученные данные могут быть использованы для определения концентраций ампициллина в водных растворах. Воздействие антибиотика приводит к существенному изменению значения коэффициента отражения S_{11} на резонансной частоте при времени воздействия 15-20 мин. Это означает, что с помощью микробного датчика на основе электродинамического СВЧ резонатора возможно провести оценку активности антибиотика в исследуемом диапазоне концентраций при времени анализа ~ 15 мин.

Преимуществом разработанного подхода является возможность проведения анализа во внелабораторных условиях за короткий промежуток времени, а также возможность полной автоматизации процедуры анализа и обработки результатов.

Представленные результаты исследовательской работы демонстрируют перспективность использования биологического датчика на основе сверхвысокочастотного резонатора для оценки антибактериальной активности препаратов.

Выводы

1. Предложено использование полимерных матриц, модифицированных плазменным травлением, в качестве носителя для иммобилизации бактерий (на примере *Escherichia coli* XL-1) при создании биосенсоров.

2. Время иммобилизации бактерий на пленках ПС составляет ~ 30 мин, полученный биокатализатор сохраняет активность в отношении ампициллина до 6 мес.

3. Биокатализатор на основе иммобилизованных бактерий может быть применен в качестве сенсорного элемента датчика для определения активности ампициллина.

4. С помощью датчика на основе электродинамического сверхвысокочастотного резонатора и микробных клеток, иммобилизованных на поверхности плёнки полистирола, можно определять антибактериальную активность препаратов при времени анализа ~ 15 мин.

Практические предложения производству

Полученные результаты представляют интерес с практической точки зрения для применения полистирола в качестве полимерного носителя, модифицированного плазменным травлением, для иммобилизации бактерий при создании биосенсоров. Разработанная сенсорная система на основе электродинамического СВЧ резонатора и микробного биокатализатора может быть использована для анализа активности образцов антибактериального препарата на всех стадиях производства антибиотиков и определения стабильности антибиотиков в процессе их хранения.

Список источников литературы

1. Александров, М.Т. Экспресс-метод лазерной флюоресцентной диагностики при заболеваниях бактериальной этиологии / М.Т. Александров, О.Г. Гапоненко, В.Е. Милюков // Вестник новых медицинских технологий, 2007. – Т.14, № 2 – С. 138.

2. Аффинные взаимодействия на поверхности пьезоэлектрического сенсора, модифицированного углеродными нанотрубками, при определении фторхинолонов / Е.И Шукшина и др. // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2018. – Т. 18. № 3. – С. 394 - 403.

3. Белоусов, Ю.Б. Клиническая фармакология и фармакотерапия / Ю.Б. Белоусов, В.С. Моисеев, В.К. Лепахин – М.: Универсум. – 1993. – 40 с.

4. Биосенсор для детекции бактериофагов на основе сверхвысокочастотного резонатора / О.И. Гулий и др. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2017. – Т.53. №6. – С.642 - 650.

5. Бриан, Л.Е. Бактериальная резистентность и чувствительность к химиопрепаратам / Л.Е. Бриан. – М.: Медицина, 1984. - 272 с.

6. Егоров, Н.С. Основы учения об антибиотиках / Н.С. Егоров. – М.: Высшая школа, 2004. – 528 с.

7. Ерохин, П.С. Применение методов атомно-силовой микроскопии для определения воздействия антибактериальных препаратов на микробную клетку (на примере *Escherichia coli* цефалоспоринов первого поколения) / П.С. Ерохин, Д.В. Уткин // Известия Сарат. университета. – 2013. – Т.13, №2. – С. 12 - 17.

8. Зимина, Т.А. Лаборатория на чипе. Микробиологическая экспресс--диагностика патогенных бактерий / Т.А. Зимина, В.В. Лучинин // Наноиндустрия. – М.: Техносфера, 2013. – № 7. – С. 67 - 75.

9. Иммобилизованные клетки микроорганизмов / А.П. Синицин и др. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1994. – 288 с.

10. Иммобилизация микробных клеток на полимерных матрицах, модифицированных плазменной обработкой / О.И. Гулий и др. // Прикл. биохимия и микробиология. – 2020. – Т.56, №2. – С. 17 – 22.

11. Использование электрооптического анализа клеточной суспензии *Escherichia coli* для определения антибактериальной активности левомицетина / Гулий О. И. и др. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2006. – № 7. – С.12 - 16.

12. Каркищенко, Н.Н. Оценка эффективности антибиотиков и бактериофагов альтернативными методами / Н.Н. Каркищенко, Л.Ю. Завальский // Биомедицина. – 2012. – № 3. – С. 15 - 17.

13. Крякунова, Е.Д. Иммобилизация микроорганизмов и ферментов / Е.Д. Крякунова, А.В. Канарский // Вестник Казанского технологического университета. – 2012. – Т.15, №17. – С.189 - 194.

14. Кукушкин, С.А. Процессы конденсации тонких пленок / С.А. Кукушкин, А.В. Осипов //Успехи физических наук. – 1998. – Т. 168. №. 10. – С. 1083 - 1116.

15. Лекарственные средства : новейший справочник / авт.-сост. И.И. Павлова. – М.: АСТ, Сова, 2012. – 251 с.

16. Литусов, Н.В. Эшерихии : иллюстрированное учебное пособие. – Екатеринбург: изд-во УГМА, 2016. – 36 с.

17. Маршелл, Э. Биофизическая химия / Э. Маршелл. – М.: Мир, 1981. – 358 с.

18. Методы выделения и идентификации энтерогеморрагической кишечной палочки *E. coli* O157:H7 : МУК 4.2.992-00. – Введ. 2001-02-04. первым заместителем министра здравоохранения Российской Федерации Г.Г. Онищенко 4 ноября 2000 г. – 53 с.

19. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Опредление чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам : МУК 4.2.1890-04. – Введ. 2004.03.04. первым заместителем

Министра здравоохранения Российской Федерации Г.Г. Онищенко, 2004. – 40 с.

20. Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар : ОФС.1.2.4.0010.1 взамен ст. ГФ XII, ч.1, ОФС 42–0068–07 / Государственная фармакопея Российской Федерации // М1 РФ. – XIII изд. – Т.1. – Москва, 2001.

21. Оценка воздействия амоксициллина на микробные клетки методом электроакустического анализа / О.И. Гулий и др. // Биофизика. – 2018. – Т.63, № 3. – С.496 - 502.

22. Пассет, Б.В. Практикум по техническому анализу и контролю в производстве химико-фармацевтических препаратов и антибиотиков / Б.В Пассет, М.А. Антипов. – М.: Медицина, 1981. – 272 с.

23. Пат. 2255978 Российская Федерация, МПК3 C12Q1/02 G01N21/64 A61B6/00. Способ люминесцентной диагностики и/или качественной оценки состояния биологического объекта и устройство для его осуществления / Александров М.Т; Москва. – № 2004119866/13; заявл. 30.06.2004: опубл. 20.06.2005, Бюл. № 17.

24. Савченко, К.Ю. Антибиотикорезистентность: факторы, механизмы и способы борьбы с явлением / К. Ю. Савченко // Молодой ученый. – 2020. – № 22. – С. 431 - 433.

25. Сидоренко, С.В. Молекулярные основы резистентности к антибиотикам / С.В. Сидоренко, В.И. Тишков // Успехи биологической химии. – М.: Просвящение, 2004 г. – Т.44. – С.263 - 306.

26. Синтез методом фотополимеризации и применение тонких пленок полимеров с молекулярными отпечатками для молекулярного распознавания цефалоспоринов / О.В. Фарафонова и др. // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2018. – Т.18, № 4. – С. 495 - 504.

27. Современная антимикробная химиотерапия : руководство для врачей / сост.: Л.С. Страчунский и др. – М.: Боргес, 2002. – 432 с.

28. Соловьев, А.В. Перспективы применения методов лазерного рассеяния света в микробиологическом анализе / А.В. Соловьев, Т.М. Зимина, А.Ф. Костко // Биотехносфера, 2017. – СПб.: Политехника. – №6 (54). – С. 11 - 20.

29. Сроки годности лекарственных средств : ОФС.1.1.0009.15 взамен ГФ XII, ч. 1, ОФС 42-0075-07 / Государственная фармакопея Российской Федерации // МЗ РФ. – XIII изд. – Т.1. – Москва, 2015

30. Стецюк, У.О. Антибиотики в амбулаторной практике: некоторые проблемы / У.О Стецюк, И.В. Андреева, А.В. Колосов // Клиническая фармакология и терапия, 2000. – Т. 9, № 2.– С. 3-6.

31. Супотницкий, М.В. Механизмы развития резистентности к антибиотикам у бактерий / М.В. Супотницкий // Биопрепараты, 2011. – № 2. – С. 4 - 11.

32. Фрунджян, В.Г. Биолюминисцентный экспресс-метод оценки антибиотикочувствительности возбудителя / В.Г Фрунджян, Н.Н. Угарова, Л.А. Блатун. – М.: ОКИ, 2009. – Т.54, №7. – С. 8 - 12.

33. Чаленко, Я.М. Исследование антибиотикорезистентности микроорганизмов электрохимическими методами / Я.М. Чаленко, В.В. Шумянцева, С.А. Ермолоева // Биомедицина. – 2012. – №1. – С.43 - 48.

34. Шайдарова, Л.Г. Определение антибиотиков тетрациклинового ряда по электрокаталитическому отклику электрода, модифицированного пленкой гетеровалентного оксида-цианида рутения / Л.Г. Шайдарова, А.В. Гедмина, И.А. Челнокова. – М.: Фолиум, 2008. – Т.42, №9. – С. 49 - 53.

35. Action of ampicillin and kanamicin on the electrophysical characteristics of Escherichia coli cells / Guliy O.I. et al. // Intern. J. Environ. Anal. Chem. – Vol. 85, № 12. – 2005. – P. 981 - 992.

36. Antibiotic Resistance Protocols: Second Edition, Gillespie SH, McHugh TD (eds.), Methods in Molecular Biology / Springer Science+Business Media // LLC. – 2010. – Vol. 642. – 47-52.

37. Arslan, F. Immobilized microbial cells / F. Arslan, S.Ustabaş, H. Arslan // Sensors. – 2011. – V.11. № 8. – P. 8152 - 8163.

38. Braga, P.C. Atomic force microscopy: application to investigation of Escherichia coli morphology before and after exposure to cefodizime / P.C Braga, D. Ricci // Antimicrob. agents and chemother. – 1998. – Vol. 42, № 1.– P. 18 - 22.

39. Bioprocess Development Department / U. Beshay // Microbiol. – 2011. – V.60. №2. – P.133 - 138.

40. Bilal, M. Microbial-derived biosensors for monitoring environmental contaminants: Recent advances and future eoutlook / M. Bilal, H.M.N. Iqbal // Process Safety and Environmental Protection. – 2019. – V.124. – P.8 - 17.

41. Bryskier, A. Classification of macrolide antibio& tics. In: Microlides: chemical structure, pharmacologycal characteristics and application in clinic / A. Bryskier, C. Agouridas, J.C Gasc // Oxford, England: Blackwell. – 1993. – P. 5 - 66.

42. Bryan, L. Mechanisms of plasmid mediated drug resistance / L. Bryan // Plasmids and Transposons. – N.Y., 1980. – P. 51 - 81.

43. Collection of Rhizosphere Microorganisms of the Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences (IBPPM RAS). – Electronic data. – 1981. Access mode: http://collection.ibppm.ru

44. Cha, MY. Pharmacophore-based strategy for the development of general and specific scv biosensors for abused antibiotics / M.Y. Cha, H.Y. Lee // Bioelectron. – 2009. – Vol. 24. – P. 2547 - 2553.

45. De-los-Santos-Alvarez. SPR sensing of small molecules with modified RNA aptamers: detection of neomycin Biosens / De-los-Santos-Alvarez, M.J. Lobo-Castañón, Miranda-Ordieres // Bioelectron. – 2009. – Vol. 24. – P. 2547 - 2553.

46. Dong, Z. Real-time and label-free detection of chloramphenicol residues with specific molecular interaction / Z. Dong, G. Huang, S. Xu // J. Microsc. – 2009, Vol.2 34, P. 255 - 261.

47. Di Pietrantonioa F. A Shear horizontal surface acoustic wave biosensor for a rapid andspecific detection of d-serine / F. Di Pietrantonioa F, M. Benettia, D. Cannatàa, E. Veronab // Sensors and Actuators. – 2016. – V. 226. – P. 1 - 6.

48. Effect of sulfonamides on the electrophysical properties of bacterial cells / Guliy O.I. et al. // Anti-Infective Agents. – 2014. – Vol. 12, № 2. – P.191 - 197.

49. Eds, O.K.C. Polymer Thin Films / O.K.C. Eds, T. Tsuiand, P. Russell // Singapore: World Sci. – 2008. – P. 267 - 294.

50. Electro-acoustic sensor for the real-time identification of the bacteriophages / O.I. Guliy et al. // Talanta. – 2018. – V.178. – P. 743 - 750.

51. Fluit, A.C. Molecular detection of antimicrobial resistance / A.C. Fluit, M.R. Visser, F. Schmitz // Clin. Microbiol. Rev. – 2001. – V. 14, № 4. – P. 836 - 871.

52. Ferguson, JP. Detection of streptomycin and dihydrostreptomycin residues in milk, honey and meat samples using an optical biosensor / JP. Ferguson, GA. Baxter, JDG. McEvoy // Analyst. – 2002. – Vol.127. – P. 951 - 956.

53. Gazouli, M. Antimicrob. Chemother Tzouvelekis / M.L. Gazouli, S. Vatopoulos // Science. – 1998. – Vol. 42. – P. 419 - 425.

54. Hagiwara, K. Effects of plasma treatments on the controlled drug release from poly (ethylene-co-vinyl acetate) / K. Hagiwara, T. Hasebe, A. Hotta // Surface and Coatings Technology. – 2013. – V. 216. – P. 318 - 323.

55. Ionescu, RE. Impedimetric immunosensor for the specific label free detection of ciprofloxacin antibiotic. Biosens / RE. Ionescu, N. Jaffrezic-Renault, L. Bouffier, C. Gondran // Bioelectron. – 2007. – Vol.23. – P. 549 - 555.

56. Kim, Y.S. Specific detection of oxytetracycline using DNA aptamer-immobilized interdigitated array electrode chip / Y.S. Kim, J.H.Niazi // Analyst. – 2008. – Vol. 121. – P. 2346 - 2367.

57. Makaraviciute, A. Site-directed antibody immobilization techniques for immunosensors / A. Makaraviciute, A. Ramanaviciene // Biosensors and bioelectronics. – 2013. – V. 50. – P. 460 - 471.

58. Moina, C. Fundamentals and Applications of Immunosensors / C. Moina, G. Ybarr // Advances in Immunoassay Technology. – 2012. P. 45 - 52.

59. Nikiyan H. AFM investigations of various disturbing factors on bacterial cells / A.Vasilchenko, D. Deryabin // Formatex. – 2010. – P. 523 - 529.

60. Otero, T.F. Polymer Sensors and Actuators / T.F. Otero, Y. Eds, D.E.De Rossi Osada. – Berlin: Springer. – 2000. – P.295 - 324.

61. Pikkemaat, MG. Application of a luminescent bacterial biosensor for the detection of tetracyclines in routine analysis of poultry muscle samples. Food Addit. Contam. Part A Chem. Control Expo / MG. Pikkemaat, MLBA. Rapallini, MT. Karp, JWA. Elferink // Risk Assess. – 2010. – Vol.27. – P.1112 - 1117.

62. Plasma-surface modification of biomaterials / P.K. Chu et al. // Mat Sci Eng R. – 2002. – V. 36. № 5. – P.143 - 206.

63. Plasma surface modification of biomedical polymers: influence on cell-material interaction / T. Jacobs et al. // Plasma Chemistry and Plasma Processing.– 2012. – V. 3, № 5. – P.1039 - 1073.

64. Rapid detection of bacterial resistance to antibiotics using AFM cantilevers as nanomechanical sensors / G. Longo et al. // Nat. Nanotechnol. – 2013. – V.8. №7. – P. 522 - 526.

65. Rebe Raz, S. Development of a biosensor microarray towards food screening, using imaging surface plasmon resonance / S. Rebe Raz, MGEG. Bremer, M. Giesbers, W. Norde // Bioelectron. – 2008. – Vol.24. – P. 552 - 557.

66. Rowe, AA. Reagentless measurement of aminoglycoside antibiotics in blood serum via an electrochemical, ribonucleic acid aptamerbased biosensor / A.A. Rowe, E.A. Miller, K.W. Plaxco // Chem. – 2010. – Vol.82. – P. 7090 - 7095.

67. Salyers, A. Why are antibiotic resistance genes so resistant to elimination / A. Salyers, C.F. Abile-Cuevas // Antimicrob. Agents Chemother. – 1997. – V. 41, № 11.– P. 2321 - 2325

68. Smith, D.H. R-factor infection of Escherichia coli lyophilized / D.H. Smith, J. Bact. – 1967. – V. 94. – P. 2071 - 2072.

69. Surface Modification of Polystyrene Thin Films by RF Plasma Treatment / A.V. Smirnov et al. // BioNanoScience. – 2017. – V.7. № 4. – P. 680 - 685.

70. Sensor for ampicillin based on a microwave electrodynamic resonator / O.I. Guliy et al. // Biosens. Bioelectron. – 2019. – V.130. – P.95 - 102.

71. Su, L. Microbial biosensors: A review / L. Su, J. Wenzhao, H. Changjun // Biosens. Bioelectron. – 2011. – V.26. №5. – P.1788 - 1799.

72. Use of an electro-optical sensor and phage-displayed miniantibodies for immunodetection of *Herbaspirillum* / O.I. Guliy et al. // Talanta. – 2019. – V.202. – P.362 - 368.

73. Use of piezoelectric immunosensors for detection of interferon-gamma interaction with specific antibodies in the presence of released-active forms of antibodies to interferon-gamma / E. Don et al. // Sensors (Basel). – 2016. – Vol.16. – P.92 - 96.

74. Van Kooten, T.G. Plasma-treated polystyrene surfaces: model surfaces for studying cell–biomaterial interactions / T.G. Van Kooten, H.T. Spijker, H.J. Busscher // Biomaterials. – 2004. – V.25, №.10. – P.1735 - 1747.

75. Virolainen, NE. Rapid detection of tetracyclines and their 4-epimer derivatives from poultry meat with bioluminescent biosensor bacteria. Agric / NE. Virolainen, MG. Pikkemaat, JWA. Elferink // Food Chem. – 2008. – Vol. 56. – P.11065 - 11070.

76. Veterinary antimicrobial sales trends in 31 European countries in 2018 from 2010 to 2018 : Tenth ESVAC report. – Electronic data. – Access mode: https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/sales-veterinary-antimicrobial-agent-31-european-countries-2018-Trends-2010-2018-tenth-esvac-report_en.eu

77. Yuan, J. Surface plasmon resonance assay for chloramphenicol without surface regeneration / J. Yuan, J. Addo, M-I. Aguilar // Biochem. – 2009, Vol.390, P. 97 - 99.

78. Zhang, J. Fast determination of the tetracyclines in milk samples by the aptamer biosensor / J. Zhang, B. Zhang, S .Jia // Analyst. – 2010. – Vol. 135. – P. 2706 - 2710.

79. *β*-glucanase productivity improvement via cell immobilization of recombinant Escherichia coli cells in different matrices / U. Beshay et al. // Microbiol. – 2011. – V.60, № 2. – P.133 - 138.

Приложения

Приложение 1

ABSTRACT BOOK

Second International Scientific Conference
PLAMIC2020
«Plants and Microbes: the Future of Biotechnology»Russia, Saratov, 5-9 October 2020

Вторая Международная научная конференция
PLAMIC2020
«Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего»

Саратов, 5-9 октября 2020.

УДК 573.4

ББК 28.07

Организаторы:

ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова»ФГБУН Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН
ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии
Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН
Уфимский институт биологии УФИЦ РАН
Институт микробиологии НАН Беларуси

Ассоциация «Аграрное образование и наука»

Под редакцией:

Тихонович И.А., Коломиец Э.И., Матора Л.Ю., Соловьёв Д.А., Проворов Н.А., Жулин И.Б.,Андронов Е.Е., Баймиев А.Х., Башкатов С.А., Белимов А.А., Веселов Д.С., Гоголев Ю.В., Голденкова-Павлова И.В., Дейнеко Е.В., Демченко К.Н., Жуков В.А., Ившина И.Б., Камнев А.А., Комахин Р.А., Коннова С.А., Константинов Ю.М., Кудоярова Г.Р., Лобакова Е.С., Логинов О.Н., Лутова Л.А., Максимов И.В., Маркова Ю.А., Мартыненко В.Б., Матвеева Т.В., Николайчик Е.А., Соколов О.И., Степанова А.Ю., Турковская О.В., Хуснутдинова Э.К., Цыганов В.Е., Цыганова А.В., Чемерис А.В., Чумаков М.И., Шакирова Ф.М., Широких И.Г., Щеголев С.Ю., Эльконин Л.А.

Оргкомитет:

Председатель – Бурыгин Г.Л.
Заместители председателя – Вершинина З.Р. и Ткаченко О.В.

Гулий О.И., Гусев Ю.С., Евсеева Н.В., Караваева О.А., Костина Е.Е., Красова Ю.В., Крючкова Е.В., Кулуев Б.Р., Курасова Л.Г., Михайлова Е.В., Нейфельд В.В., Рязанцев Н.В., Селиванова О.Г., Тычинин Д.Н., Широков А.А., Шмидт И.В., Шьюрова Н.А.
plamic2020@mail.ru; plamic2020@gmail.com

Материалы 2-ой Международной научной конференции PLAMIC2020 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» 5-9 октября 2020 г., Саратов / отв. ред. И.А. Тихонович – 2020. – 312 с. – **ISBN 978-5-7011-0816-3**

В сборнике представлены материалы международной научной конференции PLAMIC2020 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего». Авторы несут ответственность засодержание представленных ими материалов.

© Ассоциация «Аграрное образование и наука», 2020 Электронное издание.

Постоянный адрес размещения http://plamic.ru/sbornik/

Organizers:

N.I. Vavilov Saratov State Agrarian University

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of SciencesAll-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of SciencesUfa Institute of Biology, Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences

Institute of Microbiology, National Academy of Sciences of Belarus

Association "Agrarian Education and Science"Editors:

Tikhonovich I.A., Kalamiyets E.I., Matora L.Yu., Solov'yov D.A., Provorov N.A., Zhulin I., Andronov E.E., Baymiev A.Kh., Bashkatov S.A., Belimov A.A., Veselov D.S., Gogolev Yu.V., Goldenkova-Pavlova I.V., Deineko E.V., Demchenko K.N., Zhukov V.A., Ivshina I.B., Kamnev A.A., Komakhin R.A., Konnova S.A., Konstantinov Yu.M., Kudoyarova G.R., Lobakova E.S., Loginov O.N., Lutova L.A., Maksimov I.V., Markova Yu.A., Martynenko V.B., Matveeva T.V., Nikolaichik Ye.A., Sokolov O.I., Stepanova A.Yu., Turkovskaya O.V., Khusnutdinova E.K., Tsyganov V.E., Tsyganov A.V.,Chemeris A.V., Chumakov M.I., Shakirova F.M., Shirokikh I.G., Shchegolev S.Yu., Elkonin L.A.

Organizing Committee:

Chair – Burygin G.L.
Co-chairs – Tkachenko O.V. and Vershinina Z.R.

Guliy O.I., Gusev Yu.S., Evseeva N.V., Karavaeva O.A., Kostina E.E., Krasova Yu. V., Kryuchkova E.V., Kuluev B.R., Kurasova L.G., Mikhaylova E.V., Neyfeld V.V., Ryazanzev N.V.,Selivanova O.G., Tychinin D.N., Shirokov A.A., Schmidt I.V., Shyurova N.A. plamic2020@mail.ru; plamic2020@gmail.com

Abstract book of the 2nd International Scientific Conference "Plants and Microbes: the Future ofBiotechnology" PLAMIC2020, October 5-9, 2020, Saratov, Russia / Ed. I.A. Tikhonovich – 2020.
– 312 p. – **ISBN 978-5-7011-0816-3**

Abstracts submitted for presentation at PLAMIC2020 Conference in Saratov, Russia, October 5-9, 2020. They were not reviewed by the PLAMIC2020 Editorial Board and were not edited by the Organizing Committee staff.

e-Link: http://plamic.ru/sbornik/

© 2020 Association "Agrarian Education and Science"

Analysis of the antibacterial activity of ampicillin by biological sensor based on a microwave resonator

Guliy O.I.[1,2], Zaitsev B.D.[3], Smirnov A.V.[4], Karavaeva O.A.[1], Alsowaidi A.K.M.[4], Larionova O.S.[2], Borodina M.A.[2], Borodina I.A.[3]

[1]Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia; [2]Saratov State Agrarian University, Saratov, Russia; [3]Kotelnikov Institute of Radio Engineering and Electronics, Russian Academy of Sciences, Saratov Branch, Saratov, Russia; [4]Kotel'nikov Institute of Radio Engineering and Electronics, RAS, Moscow, Russia; [5]Chernyshevsky National Research State University, Saratov, Russia

E-mail: guliy_olga@mail.ru

Key message. *A method has been developed for analyzing the activity of antibacterial drugs on ampicillin as example by using a biological sensor based on a microwave resonator with an analysis time of ~ 15 minutes.*

Keywords: *microbial cells, antibacterial activity, ampicillin, microwave resonator*

One of the main points when using antibiotics is the determination of their antibacterial activity. Goal. Development of a method for analyzing the antibacterial activity of antibiotics using ampicillin as an example by biological sensor based on a microwave resonator. A detection system based on a microwave electromagnetic resonator represented a segment of a rectangular waveguide, one end of which was electrically shorted by a sealed copper plate. The second end included a standard flange with the guides for precise positioning of a lithium niobate plate with a dielectric constant of the order of 35-40. Resonance appeared on a waveguide segment bounded on one side by a copper plate, and on the other side by a lithium nibate plate with a sensitive layer. The sensitive layer of the sensor represented a thin film of polystyrene (PS), which was uniformly deposited on the surface of a lithium niobate plate and modified in a plasma of a high-frequency (HF) argon discharge. Ampicillin-sensitive microbial cells were immobilized on the surface of thin PS films. Using a coaxial-waveguide junction and a coaxial cable, this device was connected to the S-parameter meter E5071C (Agilent, USA). The reflection coefficient S11 was measured in the frequency range 5 - 8.5 GHz. Results. After immobilization of cells on the surface of PS films, the possibility of determining ampicillin activity using a microwave resonator was studied as follows. The antibiotic with the given concentration (5, 10, 25, and 50 μg/ml) was added to immobilized cells and the frequency dependence of parameter S_{11} was measured near the third resonance peak. The choice of antibiotic concentrations was determined by previous studies. It has been found that with an increase in the concentration of the antibiotic from 5 to 50 μg/ml the S_{11} value varies from –12.6 to –15.1 dB. At that, in all cases, the resonant frequency varied within the limits from 8.065 to 8.062 GHz. Thus, it is shown that the developed system can be used to determine the activity of ampicillin. This work was partially supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation and the RussianFoundation for Basic Research (project No. 19-07-00304, 20-37-70021).

Анализ антибактериальной активности ампициллина биологическим датчиком на основе сверхвысокочастотного резонатора

Гулий О.И.[1,2], Зайцев Б.Д.[3], Смирнов А.В.[4], Караваева О.А.[1], Алсовэйди А.К.М.[5], Ларионова О.С.[2], Бородина М.А.[2], Бородина И.А.[3]

[1]Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов; [2]Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова, Саратов; [3]Институт радиотехники и электроники им В.А. Котельникова РАН, Саратовский филиал, Саратов; [4]Институт радиотехники и электроники им. В. А. Котельникова РАН, Москва; [5]Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского,Саратов, Россия

Аннотация. *Разработан способ анализа активности антибактериальных препаратов на примере ампициллина биологическим датчиком на основе сверхвысокочастотного (СВЧ) резонатора при времени анализа ~ 15 мин.*

Ключевые слова: *микробные клетки, антибактериальная активность, ампициллин, сверхвысокочастотный резонатор* Одним из основных моментов при использовании антибиотиков является определение их антибактериальной активности. Цель. Развитие метода анализа антибактериальной активности антибиотиков на примере ампициллина с помощью биологического датчика на основе СВЧ резонатора. Детектирующая система на основе СВЧ электромагнитного резонатора представляла собой отрезок прямоугольного волновода, один торец которого был электрически закорочен запаянной медной пластинкой. На втором торце располагался стандартный фланец с направляющими полосками для точного позиционирования пластины ниобата лития с диэлектрической проницаемостью порядка 35 – 40. Резонанс возникал на отрезке волновода, ограниченном с одной стороны медной пластинкой, а с другой стороны – пластиной нибата лития с чувствительным слоем. Чувствительный слой датчика представлял тонкую плёнку полистирола (ПС), которая равномерно наносилась на поверхность пластины ниобата лития и модифицировалась в плазме высокочастотного (ВЧ) разряда аргона. Микробные клетки, чувствительные к ампициллину, иммобилизовали на поверхности плёнки ПС. Данное устройство с помощью коаксильно-волноводного перехода и коаксиального кабеля подключалось к измерителю S-параметров E5071C (Agilent, США). Коэффициент отражения S_{11} измерялся в диапазоне частот 5 – 8.5 ГГц. Результаты. После иммобилизации клеток на поверхности пленок ПС изучалась возможность определения активности ампициллина с помощью СВЧ резонатора следующим образом. К иммобилизованным клеткам добавляли антибиотик сзаданной концентрацией (5, 10, 25 и 50 мкг/мл) и измеряли частотную зависимость параметра S_{11} вблизи третьего резонансного пика. Выбор концентраций антибиотика был обусловлен ранее проведенными исследованиями. Установлено, что при увеличении концентрации антибиотика от 5 до 50 мкг/мл величина S_{11} изменяется от -12.6 до -15.1 дБ. При этом во всех случаях резонансная частота менялась в пределах от 8.065 до 8.062 ГГц. Установлено, что разработанная система может быть использована для определения активности ампициллина. Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации и Российского Фонда Фундаментальных Исследований (проект № 19-07-00304, 20-37-70021).

Приложение 2

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.И. ВАВИЛОВА

Сертификат

вручается

участнику национальной научно-практической конференции

«Зыкинские чтения»,

посвященной памяти д.м.н., профессора

Зыкина Леонида Федоровича

Бородиной Марии Александровне

Саратовский государственный аграрный университет

имени Н.И. Вавилова

И.о. проректора по научной и
инновационной работе
ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ

И. Л. Воротников

Саратов 2021