

УДК 534.231.3

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ДАТЧИК НА ОСНОВЕ АКУСТИЧЕСКОЙ ЩЕЛЕВОЙ МОДЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОБНЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМПИЦИЛЛИНА

© 2022 г. И. А. Бородина^а*, Б. Д. Зайцев^а, А. К. М. Алсовэиди^б,
О. А. Караваева^с, О. И. Гулий^с

^аФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова Российской академии наук, Саратовский филиал, ул. Зеленая 48, Саратов, 410019 Россия

^бФедеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования “Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского”, ул. Астраханская 83, Саратов, 410012 Россия

^сИнститут биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ “Саратовский научный центр РАН” (ИБФРМ РАН), пр. Энтузиастов 13, Саратов, 410049 Россия

*e-mail: borodinaia@yandex.ru

Поступила в редакцию 21.04.2022 г.

После доработки 24.06.2022 г.

Принята к публикации 05.07.2022 г.

Представлен биологический датчик для определения ампициллина в проводящих растворах. Датчик создан на основе акустической щелевой моды в структуре, состоящей из двух пьезопластин ниобата лития различных срезов, разделенных воздушным зазором. Одна из пьезопластин служила дном жидкостного контейнера, в который вносилась суспензия микробных клеток, чувствительных к изучаемому антибиотику. Измерялась глубина резонансных пиков на частотной характеристике полных потерь датчика. После этого в контейнер добавлялся исследуемый антибиотик, и измерения повторялись. Аналитическим сигналом, свидетельствующим о появлении антибиотика в суспензии клеток, служило изменение глубины резонансных пиков после его добавления в контейнер.

Ключевые слова: датчик на основе акустической щелевой моды, резонансные пики поглощения на частотной зависимости полных потерь датчика, ампициллин, бактериальные клетки, чувствительные к антибиотику

DOI: 10.31857/S0320791922060028

ВВЕДЕНИЕ

Интенсивное использование антибактериальных препаратов в медицине и в ветеринарии приводит к сильному загрязнению антибиотиками окружающей среды и, особенно, водных ресурсов. Антимикробные препараты попадают в водную среду со сбросами сточных вод очистных сооружений или ливневыми стоками с сельскохозяйственных угодий в результате применения антибиотиков в аквакультуре [1]. Растущий уровень применения антибиотиков может привести к глобальной экологической проблеме, поэтому существует большая потребность в постоянном мониторинге и определении антимикробных препаратов в объектах окружающей среды.

Для обнаружения противомикробных препаратов широко используются биосенсоры, которые позволяют проводить не только качествен-

ный, но и количественный анализ антибиотиков. Биосенсоры, как аналитические системы, состоят из двух компонентов: чувствительного биологического элемента и системы обнаружения. Для определения антибиотиков существуют биодатчики с различной конструкцией и механизмом действия, такие как, электрохимические [2], датчики на основе поверхностного плазмонного резонанса [3, 4] и оптические [5]. Кроме того, акустические устройства, которые широко используются для исследования различных явлений на границе “твердое тело–вязкая/проводящая жидкость” [6–9], вызывают большой интерес исследователей в плане зондирования различных биологических и химических аналитов. Эти датчики работают путем связывания изучаемого аналита с изменением параметров распространяющейся акустической волны. Указанные датчики исполь-

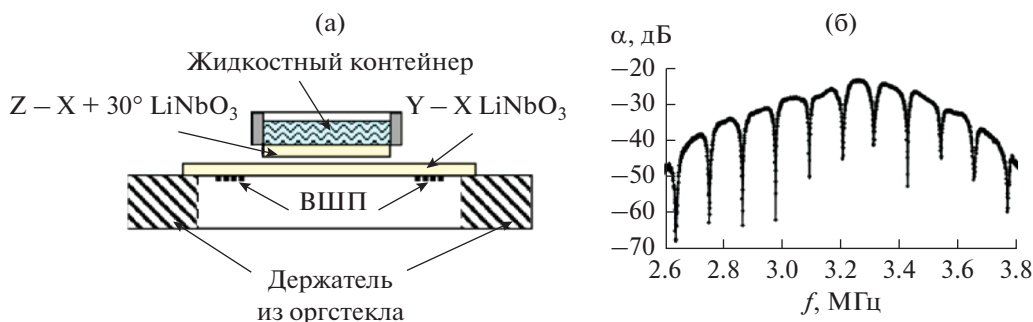


Рис. 1. (а) – Схема датчика, (б) – частотные зависимости полных потерь датчика с пустым контейнером.

зуют объемные и поверхностные акустические волны, а также волны в пьезоэлектрических пластинах [10–14]. Эти устройства могут быть миниатюризированы, масштабируемы и снабжены дополнительными функциями, включая интеграцию с микрофлюидикой и электроникой.

Одним из основных моментов при конструировании биосенсоров является подбор чувствительного (сенсорного) элемента датчика. Микроорганизмы, проявляющие чувствительность к определяемому антибиотику, в комплексе с электрофизическим датчиком представляют простые, чувствительные и быстродействующие сенсорные системы. Существует несколько разновидностей биосенсоров для обнаружения антибиотиков, основанных на оценке ингибирования ферментативной активности бактерий [15–17], а также использовании микробных клеток в качестве чувствительного элемента датчика [18, 19]. Особый интерес представляют датчики, позволяющие проводить исследование без иммобилизации специфичных микроорганизмов на поверхности датчика. Такие датчики значительно ускоряют процесс анализа по сравнению с методами, использующими иммобилизацию микроорганизмов. Ранее мы использовали датчик на основе щелевой моды в акустической линии задержки для определения чувствительности бактерий к раствору ампициллина в дистиллированной воде [20]. Однако важным моментом является возможность количественного определения антибиотика, присутствующего в проводящей жидкости.

Цель работы – экспериментальное исследование возможности определения ампициллина в проводящей жидкости с помощью датчика на основе акустической щелевой моды с использованием микробных клеток в качестве сенсорного элемента.

ОПИСАНИЕ ДАТЧИКА И МЕТОДИКИ ЭКСПЕРИМЕНТА

Акустическая сенсорная система была разработана на основе линии задержки из пластины нио-

бата лития (LiNbO_3) $Y-X$ среза толщиной 200 мкм (рис. 1а). На нижней стороне пластины были нанесены два встречно-штыревых преобразователя (ВШП) для возбуждения и приема акустической волны с поперечно-горизонтальной поляризацией в диапазоне частот 2–4 МГц. Контейнер для суспензии бактериальных клеток объемом 3 мл располагался с зазором 8 мкм над верхней стороной линии задержки. Дно жидкостного контейнера было изготовлено из пластины $Z-X+30^\circ$ ниобата лития толщиной 500 мкм [21]. Такая конструкция датчика приводила к появлению ярко выраженных резонансных пиков на частотной зависимости полных потерь, связанных с возбуждением щелевой моды [22] (рис. 1б).

Для проведения экспериментов датчик подключался к измерителю S-параметров E5071C (“Agilent”, США) и измерялись частотные зависимости полных потерь выходного сигнала устройства. Контейнер заполняли суспензией исследуемых клеток и проводили измерения глубины и частоты резонансных пиков на частотной зависимости полных потерь датчика. Затем добавляли антибиотик с определенной концентрацией и вновь измеряли параметры датчика. Аналитическим сигналом служило изменение глубины и частоты резонансных пиков на частотной зависимости полных потерь датчика после добавления ампициллина в суспензию микробных клеток. Эксперименты проводились с бактериальными клетками в буферных растворах (рН 7.0) с проводимостью 5–20 мкСм/см. Проводимость буферных растворов контролировалась с помощью кондуктометра HANNA HI 8733 (Hanna Instruments inc., США). При проведении измерений температура составляла 25–26°C.

В работе анализировался антибиотик ампициллин (Sigma, США); используемые концентрации антибиотика составляли 2, 5, 8, 12, 15 и 18 мкг/мл. В качестве сенсорного элемента датчика использовали микробные клетки *Escherichia coli* штамма K-12, поскольку ранее было показано, что они являются чувствительными к ампициллину [20]. В качестве контроля использовали бактерии, устой-

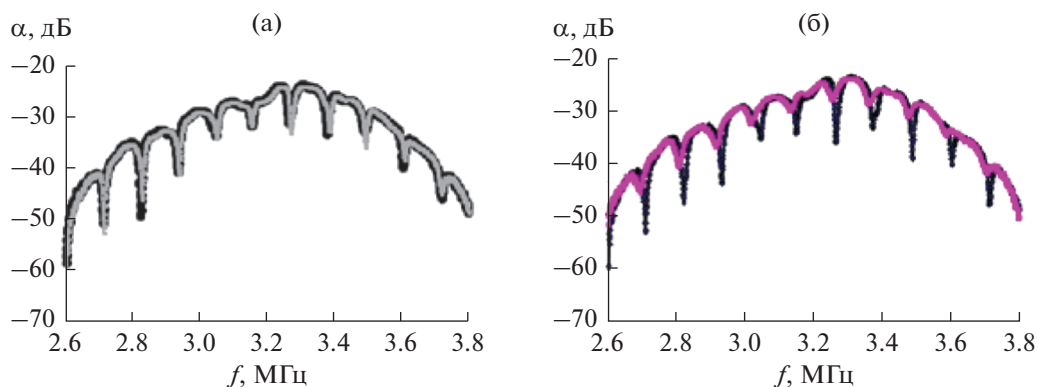


Рис. 2. (а) – Частотные зависимости полных потерь датчика (α) с контейнером, нагруженным буферным раствором с проводимостью 10 мкСм/см (черная кривая) и с *E. coli* К-12 (серая кривая). (б) – Частотные зависимости полных потерь датчика (α) с контейнером, нагруженным *E. coli* К-12 до (черная кривая) и после (розовая кривая) добавления ампициллина (2 мкг/мл).

чивые к ампициллину *E. coli* К-12 (pUC-18) [23]. Бактерии *E. coli* К-12 и *E. coli* К-12 (pUC-18) были получены из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (Саратов) (<http://collection.ibppm.ru>).

Микроорганизмы хранили при температуре +4°C и пересевали каждые 2 недели. Для культивирования бактерий использовали жидкую питательную среду LB следующего состава (г/л): NaCl (ЗАО “ЛенРеактив”, Россия) – 5.0; пептон (Wettop, Dickinson & Co., США) – 10.0; дрожжевой экстракт (DIFCO, США) – 5.0. Твердая среда LB содержала 3% агар-агара.

Для каждой серии экспериментов выполняли не менее пяти независимых повторов. Концентрационная зависимость для каждой исходной точки измерялась не менее трех раз. Данные анализировали с помощью программного обеспечения Excel 2016 (Microsoft Corp., США).

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Вначале в контейнер датчика вносили буферный раствор с заданной проводимостью (1 мл) и измеряли частотные зависимости полных потерь датчика для этого случая. После этого контейнер очищали, просушивали и добавляли в него буферный раствор с микробными клетками *E. coli* штамма К-12 в количестве 1 мл. Концентрация клеток в контейнере для всех экспериментов составляла 10^6 кл/мл. Было установлено, что добавление к буферному раствору микробных клеток практически не влияло на частотные характеристики устройства. На рис. 2а в качестве примера представлены частотные зависимости полных потерь датчика для контейнера, нагруженного буферным раствором с проводимостью 10 мкСм/см и клетками штамма К-12. Далее в контейнер с клеточной суспензией добавляли 10 мкл ампициллина с различной концентрацией от 2 до

18 мкг/мл. Было установлено, что для всех используемых концентраций антибиотика наблюдалось уменьшение глубины и частоты резонансных пиков на частотной зависимости полных потерь. На рис. 2б в качестве примера представлены частотные зависимости полных потерь датчика (α) с суспензией клеток штамма К-12 до (черная кривая) и после (розовая кривая) добавления ампициллина с концентрацией 2 мкг/мл при проводимости буферного раствора 10 мкСм/см. В результате проведенных экспериментов были найдены зависимости изменения глубины пиков резонансного поглощения от концентрации ампициллина при различной начальной проводимости буферного раствора. На рис. 3 представлены зависимости изменения глубины резонансного пика ($\Delta\alpha$) вблизи частоты 2.82 МГц от концентрации ампициллина после его добавления к суспензии клеток при начальной проводимости буферного раствора 5 (рис. 3а), 10 (рис. 3б), 15 (рис. 3в) и 20 (рис. 3г) мкСм/см. Видно, что для всех исследуемых проводимостей буферного раствора максимальное изменение глубины выбранного резонансного пика наблюдается для концентрации ампициллина 2 мкг/мл. При увеличении концентрации ампициллина изменение глубины резонансных пиков немного уменьшается. Наименьшее изменение глубины резонансного пика наблюдается для концентраций ампициллина 15 и 18 мкг/мл. Что касается частоты пиков резонансного поглощения, то во всех случаях наблюдался сдвиг резонансной частоты на 10–20 кГц.

Было также показано, что с увеличением начальной проводимости буферного раствора изменение глубины резонансных пиков уменьшается. На рис. 4 в качестве примера приведены зависимости изменения глубины пиков резонансного поглощения ($\Delta\alpha$) от начальной проводимости буферного раствора (σ) при добавлении к *E. coli* К-12

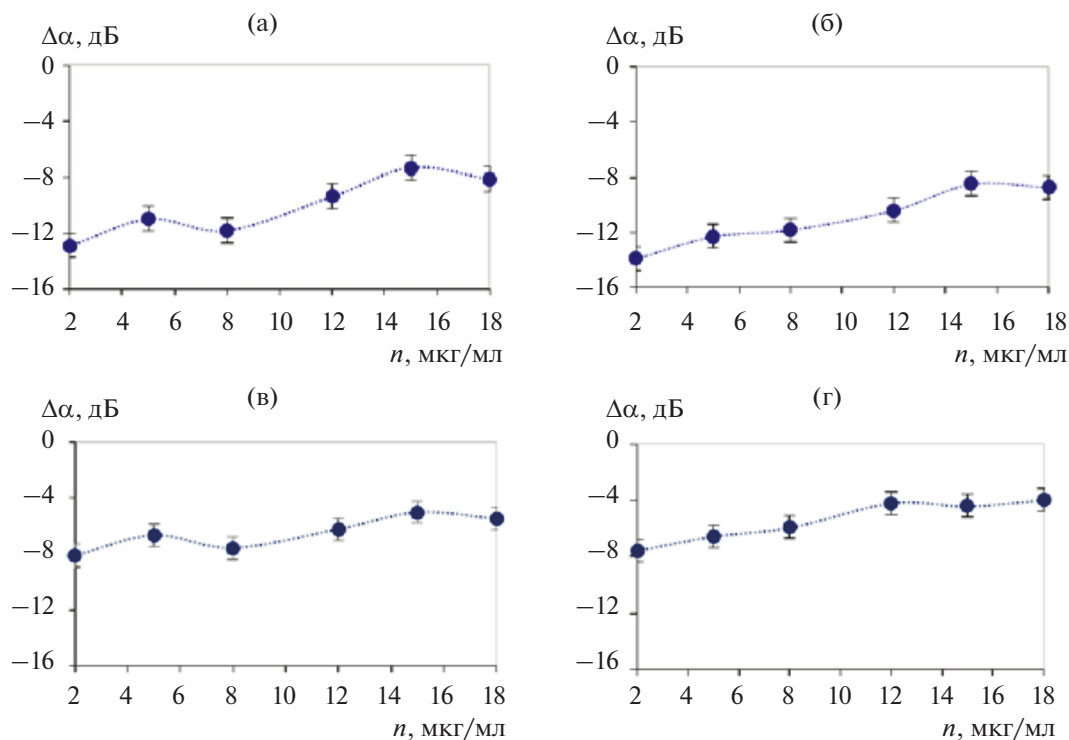


Рис. 3. Зависимости изменения глубины резонансного пика ($\Delta\alpha$) для *E. coli* К-12 вблизи частоты 2.82 МГц от концентрации ампициллина в буферных растворах с начальной проводимостью (мкСм/см): (а) – 5, (б) – 10, (в) – 15 и (г) – 20.

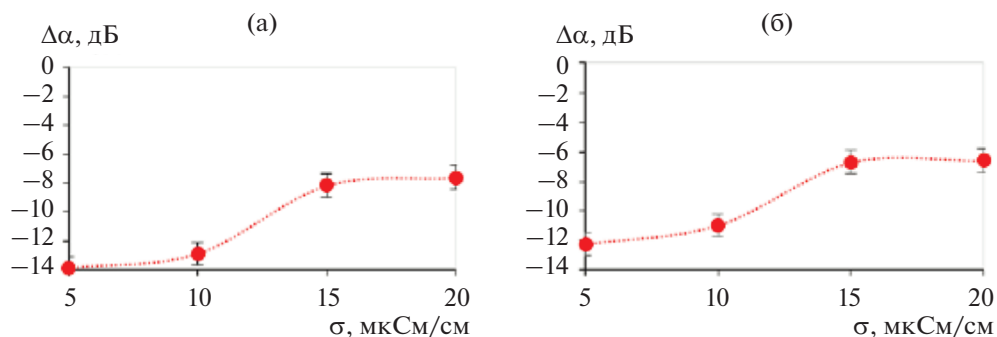


Рис. 4. Зависимости изменения глубины пиков резонансного поглощения ($\Delta\alpha$) для *E. coli* К-12 от начальной проводимости буферного раствора (σ) при добавлении ампициллина до конечной концентрации (мкг/мл): (а) – 2 и (б) – 5.

ампициллина с концентрацией: 2 мкг/мл (рис. 4а) и 5 мкг/мл (рис. 4б).

Активность ампициллина определяется его способностью взаимодействовать с клеточной поверхностью бактерий и изменять барьерные свойства цитоплазматической мембраны [18]. Можно предположить, что зафиксированное датчиком изменение сигнала при увеличении концентрации ампициллина вызвано деформацией клеточной стенки бактерий, изменением ее проницаемости как для внутриклеточных, так и внеклеточных компонентов и выходом из клетки макромолекул цитоплазмы, приводящем к росту

проводимости суспензии. Этот процесс фиксируется датчиком как уменьшение глубины и частоты резонансных пиков на частотной зависимости полных потерь датчика.

Для подтверждения того, что зафиксированные изменения аналитического сигнала датчика связаны с чувствительностью бактерий к ампициллину, были поставлены эксперименты по анализу аналитического сигнала датчика для бактериальных клеток, устойчивых к ампициллину. Этот штамм обладал плазмидой pUC-18, отвечающей за устойчивость к ампициллину. Условия проведения измерений были такими же, как и для

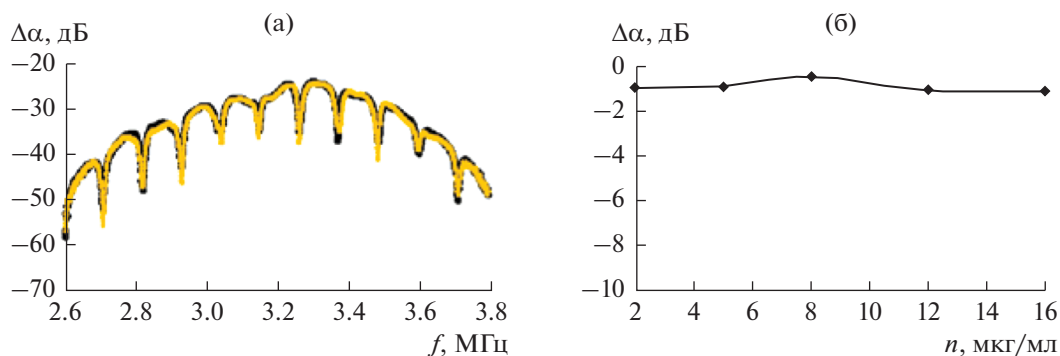


Рис. 5. (а) – Частотная зависимость полных потерь датчика, нагруженного *E. coli* К-12 (pUC-18) до (черная кривая) и после (оранжевая кривая) добавления ампициллина (5 мкг/мл). (б) – Зависимость изменения глубины резонансного пика для *E. coli* К-12 (pUC-18) вблизи частоты 2.82 МГц от концентрации ампициллина.

штамма К-12. Было показано, что добавление ампициллина к клеткам К-12 (pUC-18) не приводит к изменению глубины и частоты резонансных пиков на частотной зависимости полных потерь выходного сигнала датчика при концентрации ампициллина в пределах 2–16 мкг/мл. На рис. 5а в качестве примера представлена частотная зависимость полных потерь датчика, нагруженного клеточной суспензии *E. coli* К-12 (pUC-18), до (черная кривая) и после (оранжевая кривая) добавления ампициллина с концентрацией 5 мкг/мл при начальной проводимости суспензии клеток 20 мкСм/см. На основе полученных частотных зависимостей была построена зависимость изменения глубины резонансного пика вблизи частоты 2.8 МГц от концентрации ампициллина (рис. 5б). Видно, что изменение глубины резонансного пика для указанных концентраций ампициллина не превышало 1 дБ. Частота в этом случае практически не изменялась.

Таким образом, представленный биологический акустический датчик с использованием микробных клеток в качестве сенсорного элемента является перспективным для определения ампициллина в водных средах с нижним пределом детекции 2 мкг/мл при проводимости суспензии клеток 5–20 мкСм/см.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показали возможность применения датчика на основе акустической щелевой моды с использованием микробных клеток в качестве сенсорного элемента для определения ампициллина в проводящей жидкости. Представленная сенсорная система для обнаружения ампициллина представляет уникальную альтернативу традиционным диагностическим тестам и может быть адаптирована для других групп антибактериальных препаратов. Преимуществами данного подхода являются воз-

можность проведения анализа непосредственно в жидкости и многократность использования датчика без снижения чувствительности сенсорной системы. В целом, полученные результаты показывают перспективность использования биологического акустического датчика для определения антибиотиков в условиях повышенной проводимости среды измерения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 22-29-00587, <https://rscf.ru/project/22-29-00587/>.

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ierapetritou M., Muzzio F., Reklaitis G.* Perspectives on the continuous manufacturing of powder-based pharmaceutical processes // *AIChE J.* 2016. V. 62. P. 1846–1862. <https://doi.org/10.1002/aic.15210>
2. *Wong A., Scontri M., Materon E.M., Lanza M.R.V., Sotomayor M.D.P.T.* Development and application of an electrochemical sensor modified with multi-walled carbon nanotubes and graphene oxide for the sensitive and selective detection of tetracycline // *J. Electroanal. Chem.* 2015. V. 757. P. 250–257. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2015.10.001>
3. *Mungroo N.A., Neethirajan S.* Biosensors for the detection of antibiotics in poultry industry – a review // *Biosensors.* 2014. V. 4. P. 472–493. <https://doi.org/10.3390/bios4040472>
4. *Luo Q., Yu N., Shi C., Wang X., Wu J.* Surface plasmon resonance sensor for antibiotics detection based on photo-initiated polymerization molecularly imprinted array // *Talanta.* 2016. V. 161. P. 797–803. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.09.049>
5. *Guliy O.I., Evstigneeva S.S., Bunin V.D.* Bacteria-based electro-optical platform for ampicillin detection in aquatic solutions // *Talanta.* 2021. V. 225. P. 122007. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.122007>

6. Анисимкин В.И., Воронова Н.В. Особенности генерации нормальных акустических волн высших порядков в тонких пьезоэлектрических пластинах // Акуст. журн. 2020. Т. 66. № 1. С. 3–7.
7. Минаков А.В., Пряжников М.И., Дамдинов Б.Б., Немцев И.В. Исследование объемной вязкости наносупензий методом акустической спектроскопии // Акуст. журн. 2022. Т. 69. № 2. С. 182–189.
8. Кравчук Д.А., Старченко И.Б., Орда-Жигулина Д.В., Воронина К.А. Исследование оптоакустических сигналов на моделях эритроцитов в жидкости с контрастными наноагентами // Акуст. журн. 2021. Т. 67. № 3. С. 345–348.
9. Подымова Н.Б., Карабутов А.А. Преобразование термооптически возбуждаемых широкополосных импульсов продольных акустических волн в импульсы сдвиговых волн в изотропной твердотельной пластине в жидкости // Акуст. журн. 2021. Т. 67. № 5. С. 482–492.
10. Gruhl F.J., Länge K. Surface acoustic wave (SAW) biosensor for rapid and label-free detection of penicillin G in milk // Food Anal. Methods. 2014. V. 7. P. 430–437. <https://doi.org/10.1007/s12161-013-9642-4>
11. Gaudin V., Fontaine J., Maris P. Screening of penicillin residues in milk by a surface plasmon resonance-based biosensor assay: comparison of chemical and enzymatic sample pre-treatment // Anal. Chim. Acta. 2001. V. 436. № 2. P. 191–198. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)00948-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)00948-5)
12. Nair M.P., Teo A.J.T., Li K.H.H. Acoustic biosensors and microfluidic devices in the decennium: principles and applications // Micromachines 2022. V. 13. P. 24. <https://doi.org/10.3390/mi13010024>
13. Fogel R., Limson J., Seshia A.A. Acoustic biosensors // Essays Biochem. 2016. V. 60. № 1. P. 101–110. <https://doi.org/10.1042/EBC20150011>
14. Анисимкин В.И., Покусаев Б.Г., Складнев Д.А., Сорочкин В.В., Тюпа Д.В. Применение акустоэлектронной методики для исследования упорядоченных микроструктурированных дисперсных систем с биологическими объектами, включенными в гидрогель // Акуст. журн. 2016. Т. 62. № 6. С. 738–743.
15. Ferrini A.M., Mannoni V., Carpico G., Pellegrini G.E. Detection and identification of β -lactam residues in milk using a hybrid biosensor // J. Agric. Food Chem. 2008. V. 56. P. 784–788. <https://doi.org/10.1021/jf071479i>
16. Das S., Kumar N., Vishweswaraiah R.H., Haldar L., Gaare M., Singh V.K., Puniya A.K. Microbial based assay for specific detection of β -lactam group of antibiotics in milk // J. Food Sci. Technol. 2014. V. 51. P. 1161–1166. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0609-4>
17. Babington R., Matas S., Marco M.P., Galve R. Current bioanalytical methods for detection of penicillins // Anal. Bioanal. Chem. 2012. V. 403. P. 1549–1556. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5960-4>
18. Lu M.-Y., Kao W.-C., Belkin S., Cheng J.-Y. A smart-phone-based whole-cell array sensor for detection of antibiotics in milk // Sensors. 2019. V. 19. P. 3882. <https://doi.org/10.3390/s19183882>
19. Guliy O.I., Zaitsev B.D., Smirnov A.V., Karavaeva O.A., Borodina I.A. Sensor for ampicillin based on a microwave electrodynamic resonator // Biosens. Bioelectron. 2019. V. 130. P. 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.01.030>
20. Guliy O.I., Zaitsev B.D., Borodina I.A. New approach for determination of antimicrobial susceptibility to antibiotics by an acoustic sensor // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2020. V. 104. P. 1283–1290. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10295-2>
21. Borodina I.A., Zaitsev B.D., Burygin G.L., Guliy O.I. Sensor based on the slot acoustic wave for the non-contact analysis of the bacterial cells – antibody binding in the conducting suspensions // Sensors and Actuators B. 2018. V. 268. P. 217–222. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.04.063>
22. Borodina I.A., Zaitsev B.D., Kuznetsova I.E., Teplykh A.A. Acoustic waves in a structure containing two piezoelectric plates separated by an air (vacuum) gap // IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control. 2013. V. 60. № 12. P. 2677–2281.
23. Antibiotic Resistance Protocols: Second Edition / Eds. Gillespie S.H., McHugh T.D. Methods in Molecular Biology. 2010. V. 642. Springer Science+Business Media, LLC.