

## ОЦЕНКА ВОЗДЕЙСТВИЯ АМОКСИЦИЛЛИНА НА МИКРОБНЫЕ КЛЕТКИ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОАКУСТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

© 2018 г. О.И. Гулий\* \*\*, Б.Д. Зайцев\*\*\*, А.С. Семёнов\*\*\*, О.С. Ларионова\*\*, О.А. Караваева\*, И.А. Бородина\*\*\*

\*Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, 410049, Саратов, пр. Энтузиастов, 13

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

\*\*\*Саратовский филиал Института радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН, 410019, Саратов, ул. Зеленая, 38

E-mail: gulyi\_olga@mail.ru

Поступила в редакцию 21.04.17 г.

После доработки 12.12.17 г.

Впервые на примере амоксициллина продемонстрирована возможность регистрации методом электроакустического анализа воздействия  $\beta$ -лактамов на микробные клетки *Escherichia coli*. В качестве биологического датчика использовали пьезоэлектрический резонатор с поперечным электрическим полем, содержащий жидкостной контейнер емкостью порядка 1 мл. Установлено, что частотные зависимости реальной и мнимой частей электрического импеданса резонатора, нагруженного суспензией чувствительных клеток при добавлении антибиотика, значительно отличаются от зависимостей резонатора с контрольной суспензией микробных клеток без добавления амоксициллина. В случае суспензии устойчивых к антибиотикам клеток указанные зависимости практически не различаются. Представленные результаты демонстрируют перспективность использования методов электроакустического анализа для регистрации воздействия бета-лактамов антибиотиков на микробные клетки и оценки их антибактериальной активности.

*Ключевые слова:* *Escherichia coli*; амоксициллин, метод электроакустического анализа, пьезоэлектрический резонатор с поперечным электрическим полем, антибактериальная активность.

Одним из основных вопросов при изучении адаптации микробов к действию антибиотиков является определение чувствительности бактерий к антимикробным препаратам. Поэтому разработка новых технологий и методов определения чувствительности бактерий к действию антимикробных препаратов весьма актуальна. Методы определения чувствительности бактерий к антибиотикам делятся на две группы – диффузионные методы и методы разведения. Диффузионные методы могут быть осуществлены как с использованием дисков с антибиотиками, так и с помощью Е-тестов [1–3]. Из методов разведения используют либо разведение в жидкой питательной среде (бульоне), либо разведение в агаре [1–4]. Созданы автоматизированные системы для определения чувствительности бактерий к антибиотикам. В одних системах автоматизированы только операции разведения и инкубации, тогда как рост бактерий определяется традиционными методами. В других системах все начальные операции выполняются вручную и автоматизированы лишь этапы считывания и регистрации результатов.

Некоторые системы автоматизации предусматривают создание программ для всех операций, используемых в определении чувствительности бактерий к антибактериальным препаратам (приготовление образца и бактериального посева материала, инкубация, считывание результатов и их регистрация) [1,5–7].

Различные методы, такие как ресузурин-редукционные анализы [8] микобактериальный индикатор роста [9] или метод полимеразной цепной реакции [10], были использованы для исследования метаболизма и ответа микробных клеток на действие антибиотиков. Однако многие из них характеризуются дороговизной или неспособностью различать мертвые бактерии.

В работе [11] описано, что флуктуации высокочувствительного кантилевера атомного силового микроскопа, используемого для обнаружения бактерий в низких концентрациях, характеризуют их метаболизм и количественное определение (в течение нескольких минут) в ответ на действие антибиотиков на примере клеток *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*.

Методы электрофизического анализа (в том числе и электроакустические) микробных клеток при воздействии на них антибактериальных препаратов являются весьма перспективными для оценки воздействия антибиотиков на микробные клетки. Например, в работе [12] предложен пьезокварцевый сенсор на основе сульфаметоксазол-белкового конъюгата для проточного определения сульфаниламидов в объектах окружающей среды (до 0,15 нг/мл). В качестве рецепторных молекул использованы поликлональные антитела, перекрестно реагирующие с сульфаметазинном, гемисукцинатом сульфаметазина и стрептоцидом, которые являются структурными аналогами сульфаметоксазола.

В работе [13] показана возможность контроля в реальном масштабе времени состояния бактериальной биопленки (в том числе и после воздействия на клетки антибиотиков) на поверхности пьезоэлектрического резонатора путем измерения его резонансной частоты. Однако данная методика имеет недостаток, поскольку система подвержена влиянию температуры, колебания которой также могут привести к изменению резонансной частоты.

Особое внимание уделяется пьезоэлектрическим резонаторам с поперечным электрическим полем, в которых отсутствует контакт исследуемого материала с металлическими электродами и которые более чувствительны к контактирующей жидкости, так как реагируют на изменение как механических, так и электрических ее свойств. Ранее была показана возможность определения и идентификации микробных клеток путем регистрации их специфического взаимодействия с другими микроорганизмами (бактериофагами [14], антителами [15] и с миниантителами [16]) с помощью датчиков на основе таких резонаторов. Задача, поставленная в настоящей статье, заключается в исследовании возможности применения разработанных датчиков для оценки воздействия антибактериальных препаратов (антибиотиков) на микробные клетки, поскольку этот механизм взаимодействия отличается от механизма взаимодействия антител и бактериофагов с микробными клетками. Запланированное исследование представляет большой интерес, поскольку метод акустического анализа проводится в течение короткого промежутка времени непосредственно в жидкой фазе без нанесения на поверхность активных реагентов [16–18].

Таким образом, целью работы являлось исследование возможности применения метода электроакустического анализа для регистрации воздействия бета-лактамных антибиотиков на микробные клетки *Escherichia coli*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Бактериальные штаммы и условия выращивания бактерий.** В работе использовали бактерии *Escherichia coli* K-12 и *Escherichia coli* K-12 (pUC-18), полученные из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (Саратов).

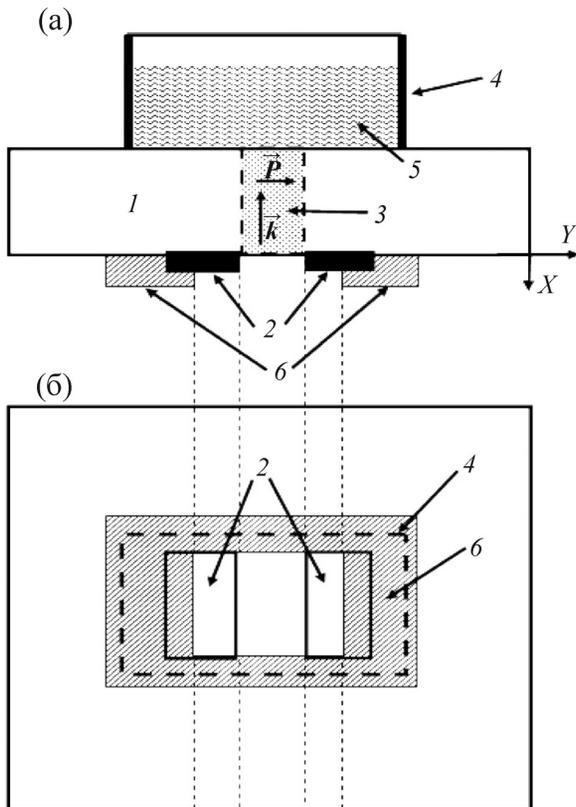
Микроорганизмы хранили при 4°C и пересевали каждые две недели.

Для культивирования бактерий использовали жидкую питательную среду LB [19] следующего состава (г/л): NaCl (ЗАО «ЛенРеактив», Россия) – 5,0; пептон (Becton, Dickinson & Co., США) – 10,0; дрожжевой экстракт (DIFCO, США) – 5,0. Полужидкая среда LB содержала 0,7% агар-агара; твердая – 1,5 и 3% агар-агара.

**Проведение анализа с помощью электроакустического датчика.** Все эксперименты по изучению изменений физических свойств суспензий микробных клеток при взаимодействии с антибиотиками проводили с помощью специально изготовленного датчика на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем в диапазоне частот 6–7 МГц. Этот датчик, представленный на рис. 1, был разработан сотрудниками лаборатории физической акустики в Саратовском филиале Института радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН [20]. Основой датчика является пластина (1) ниобата лития X-среза толщиной 0,5 мм. На нижней стороне пластины были нанесены два прямоугольных электрода (2) размерами 5-10 мм<sup>2</sup> с зазором между ними 3 мм. Область вокруг электродов и часть электродов были покрыты специальным лаком (6), который демпфировал паразитные волны Лэмба [20] и обеспечивал достаточно высокую добротность ~630. Возбуждаемая акустическая волна (3) с поперечной электрической поляризацией (вектор  $P$ ) распространялась вдоль нормали к поверхности пластины (волновой вектор  $k$ ). На верхней стороне пластины был приклеен жидкостной контейнер (5) объемом ~1 мл.

Для проведения анализа подготовленную суспензию микробных клеток вносили в вышеупомянутый жидкостной контейнер и проводили измерение частотных зависимостей реальной и мнимой частей электрического импеданса датчика с помощью прецизионного измерителя LCR параметров 4285A (Agilent, США). Затем добавляли антибиотик и измерения повторяли.

Все эксперименты проводили не менее пяти раз. Относительная погрешность результатов измерений исследуемых образцов составляла ±2%, т.е. при проведении нескольких экспериментов с одним и тем же взаимодействием суспензии клеток с антибиотиком значения ре-



**Рис. 1.** Схема акустического датчика, содержащего резонатор с двумя прямоугольными электродами на пластине ниобата лития X-среза и жидкостной контейнер. Вид сбоку (а) и снизу (б) на биологический датчик: 1 – пьезоэлектрическая пластина, 2 – электроды, 3 – акустический луч, 4 – контейнер для жидкости, 5 – жидкость, 6 – демпфирующий слой лака,  $k$  и  $P$  – направления волнового вектора и электрической поляризации соответственно, X и Y – кристаллографические оси пластины.

альной и мнимой частей электрического импеданса имеют разброс значений на любой частоте в пределах  $\pm 2\%$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поскольку в клинической практике при выборе антибиотиков руководствуются принципом принадлежности антибактериального препарата к определенной группе, в работе использовали одну из наиболее многочисленных групп, а именно  $\beta$ -лактамы антибиотики [4]. В качестве индикаторного препарата использовали амоксициллин, поскольку антибиотик активен в отношении ряда грамотрицательных палочек, в качестве объекта исследования использовались микробные клетки *E. coli*.

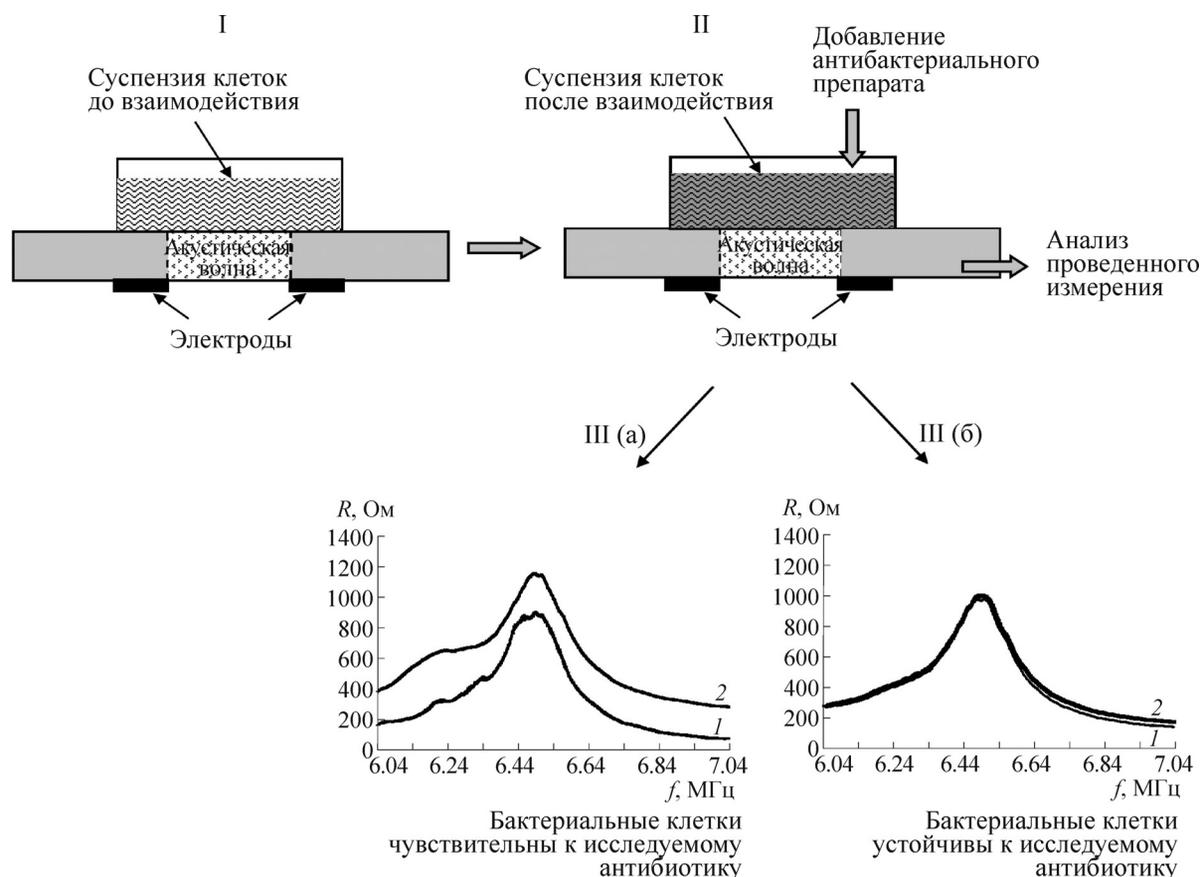
Идея экспериментов заключалась в сравнительном исследовании при действии амоксициллина изменений физических параметров су-

спензий клеток *E. coli*, различающихся по устойчивости к изучаемому антибиотику, а также в изучении возможности количественного определения минимальной ингибирующей активности препарата. Общая схема проведения экспериментов представлена на рис. 2.

После предварительной оптимизации условий проведения анализа (выбор рабочей частоты, времени измерения электрического импеданса, количества микробных клеток в измерительной ячейке) был выбран диапазон частот 6–7 МГц с временем измерения импеданса ~ 10 мин. В жидкостной контейнер каждый раз вносили микробные клетки в количестве  $10^8$  кл./мл.

Воздействие разных концентраций амоксициллина на бактериальные клетки штамма К-12 оценивали путем регистрации изменения физических параметров суспензии этих клеток, которые соответствовали изменениям частотных зависимостей реальной и мнимой частей электрического импеданса датчика. Для этого в жидкостной контейнер вносили суспензию клеток *E. coli* К-12, подготовленную для анализа, и измеряли частотные зависимости реальной и мнимой частей электрического импеданса. Эти зависимости использовали в качестве контроля. Затем к суспензии клеток добавляли антибиотик с заданной концентрацией и повторяли измерения. В экспериментах использовали следующие значения концентрации антибиотика: 2,5, 5,0, 7,5, 10,0 и 20,0 мкг/мл. Как видно из представленных на рис. 3 данных, изменение электрического импеданса происходило уже при минимальном количестве амоксициллина в образце (2,5 мкг/мл). Полученные данные позволили построить зависимость изменения максимального значения реальной части импеданса на резонансной частоте от концентрации антибиотика, которая приведена на рис. 3в. Видно, что с увеличением удельного количества вносимого антибиотика в клеточную суспензию изменение реальной части импеданса во всем диапазоне увеличивается вплоть до количества антибиотика 7,5 мкг/мл. Такая зависимость изменения величины электроакустического сигнала обусловлена, вероятно, механизмом действия антибиотика.

*Enterobacteriaceae* принято считать чувствительными при их ингибировании амоксициллином в концентрации  $\leq 8$  мкг/мл амоксициллина. Можно предположить, что зафиксированные датчиком изменения сигнала при концентрации амоксициллина вплоть до 7,5 мкг/мл (рис. 3) обусловлены бактериостатическим действием антибиотика, при котором клетки утрачивают способность к образованию перегородок в про-

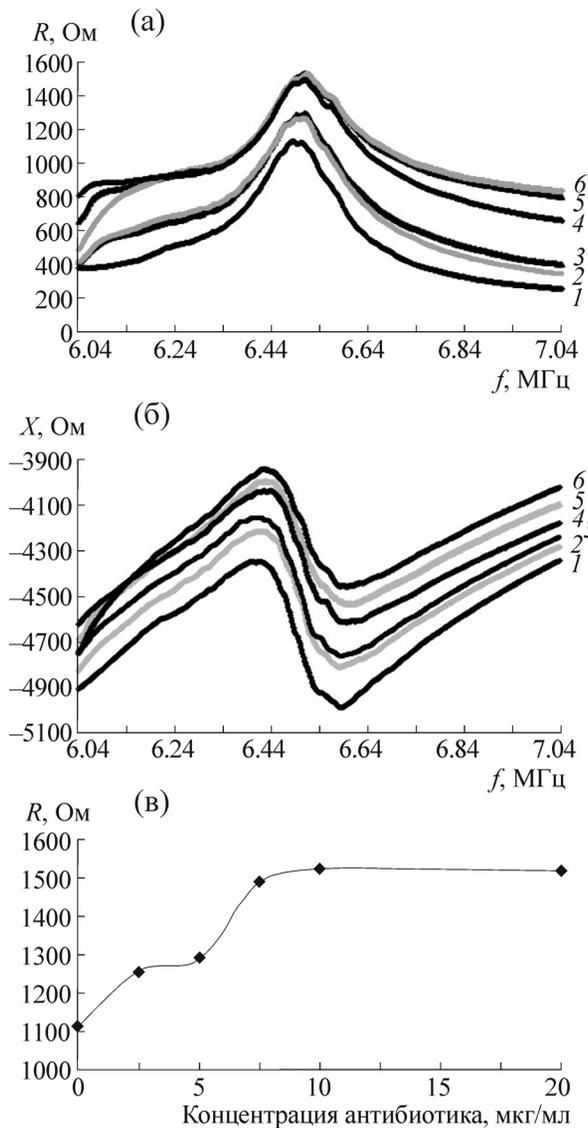


**Рис. 2.** Общая схема проведения экспериментов с использованием акустического датчика. Процесс измерения состоит из следующих моментов: I – в измерительную ячейку вносится суспензия микробных клеток и измеряется аналитический сигнал; II – в измерительную ячейку вносится исследуемый антибиотик и измерения повторяются; III – проводится анализ полученных данных и делается вывод о чувствительности/устойчивости микробных клеток к анализируемому антибиотику: III (а) – если микробные клетки чувствительны к антибиотику, значения регистрируемых параметров для суспензий клеток с препаратом (кривая 2) и без него (кривая 1) значительно различаются; III (б) – если микробные клетки устойчивы к действию антибактериального препарата значения регистрируемых параметров для суспензий клеток с антибиотиком (кривая 2) и без него (кривая 1) практически не различаются.

процессе деления. Это явление препятствует процессу их деления и происходит образование волокнистых бактерий. Наряду с этим деформация клеточной оболочки увеличивается, и это приводит к изменению ее проницаемости как для внутриклеточных, так и внеклеточных компонентов и выходом из клетки макромолекул цитоплазмы, сопровождающимся изменением проводимости суспензии. Этот процесс приводит к возрастанию максимального значения реальной части импеданса, как показано на рис. 3в. При больших значениях концентрации (8–20 мкг/мл) амоксициллин проявляет бактерицидное действие, которое приводит к лизису клеток, наступающему при деформации клеточной оболочки [21]. При этом зависимость максимального значения реальной части импеданса стремится к насыщению. Таким образом, метод акустического анализа подтвер-

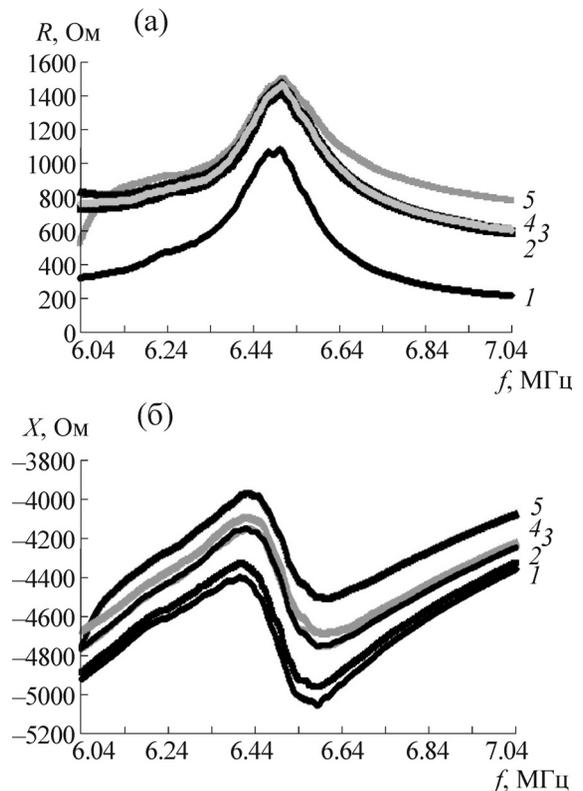
ждает чувствительность микробных клеток к воздействию амоксициллина.

Далее изучали динамику изменения физических параметров суспензии клеток *E. coli* K-12 при инкубации с амоксициллином. Поскольку при использовании антибиотика с концентрацией 5 мкг/мл изменение реальной части электрического импеданса вблизи резонансной частоты составляло ощутимую величину (17%), в последующих экспериментах использовали антибиотик именно этой концентрации. Для этого суспензии клеток инкубировали с антибиотиком при 30°C в течение различного времени (5, 10, 20 и 30 мин) и проводили измерения частотных зависимостей реальной и мнимой частей электрического импеданса. Было показано (рис. 4), что после пятиминутной инкубации клеток штамма K-12 с антибиотиком происходит наиболее значительное увеличение величины сиг-



**Рис. 3.** Частотные зависимости реальной (а) и мнимой (б) частей электрического импеданса при воздействии амоксициллина на микробные клетки *E. coli* К-12: 1 – контроль (суспензия клеток без добавления антибиотика); 2, 3, 4, 5 и 6 – суспензии клеток с добавлением разных концентраций антибиотика (2,5, 5,0, 7,5, 10,0 и 20,0 мкг/мл соответственно). (в) – Зависимость изменения максимальной величины реальной части электрического импеданса от концентрации амоксициллина.

нала. В дальнейшем параметры клеточной суспензии *E. coli* К-12 практически не зависели от времени воздействия антибиотика. Это объясняется тем, что изменение проницаемости мембраны происходит сразу после контакта бактериальной клетки с препаратом. Незначительное увеличение аналитического сигнала после пятиминутной инкубации клеток штамма К-12 с антибиотиком может быть объяснено повреждением мембраны клеток, поскольку антибио-

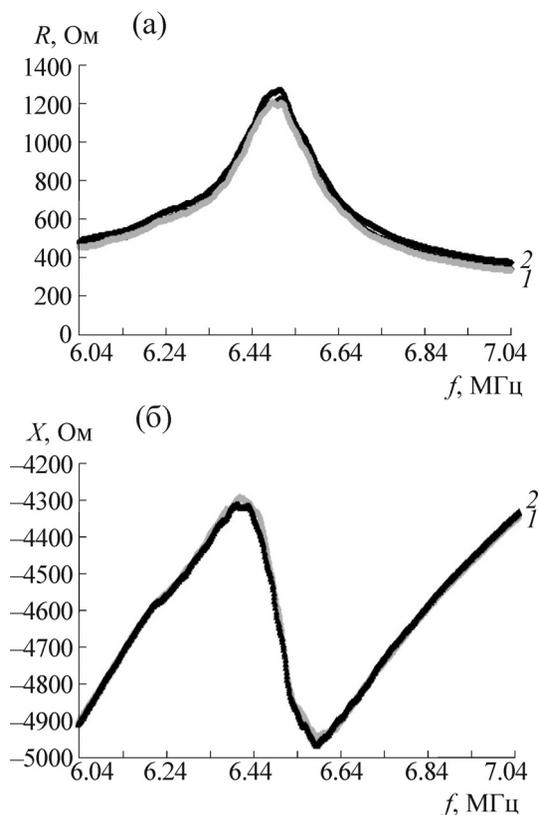


**Рис. 4.** Частотные зависимости реальной (а) и мнимой (б) частей электрического импеданса при воздействии на микробные клетки *E. coli* К-12 амоксициллина в течение различного временного интервала: 1 – суспензия клеток без добавления антибиотика; 2, 3, 4 и 5 – суспензии клеток после инкубации с антибиотиком в течение 5, 10, 20 и 30 мин соответственно.

тик поглощается клеткой в течение порядка 2 мин [22].

Были поставлены эксперименты по изучению влияния амоксициллина на изменение физических параметров суспензии клеток *E. coli* рUC-18, обладающего плазмидой рUC-18, несущей устойчивость к амоксициллину. Условия проведения эксперимента были точно такими же, как и при использовании клеток *E. coli* К-12. Из представленных на рис. 5 данных видно, что в этом случае частотные зависимости реальной и мнимой частей импеданса не изменялись при добавлении антибиотика.

Для дополнительного контроля чувствительности клеток *E. coli* штаммов К-12 и рUC-18 к антибиотику проводили их посев на питательную среду LB с амоксициллином. Затем культуры клеток инкубировали при постоянной температуре 30°C в течение суток. При этом рост культуры клеток *E. coli* штамма К-12 отсутствовал, но наблюдался хороший рост клеток штамма рUC-18.



**Рис. 5.** Частотные зависимости реальной (а) и мнимой (б) частей электрического импеданса при воздействии амоксициллина на микробные клетки *E. coli* rUC-18: 1 – контроль (суспензия клеток без добавления антибиотика), 2 – суспензия клеток с добавлением антибиотика.

При сравнении результатов исследований для суспензий клеток, чувствительных и устойчивых к исследуемому антибиотику штаммов, видно (рис. 4 и 5), что при воздействии антибиотика на микробные клетки акустический датчик фиксирует изменение выходных параметров лишь при условии, что штамм является чувствительным к действию изучаемого антибиотика. У клеток, устойчивых к изучаемому антибиотику, указанные изменения не наблюдаются. Следовательно, данные, полученные с помощью вышеописанного электроакустического датчика, полностью подтверждают результаты микробиологического анализа.

Таким образом, установлено, что изменения физических параметров суспензий клеток при действии амоксициллина значительно отличаются для чувствительных и резистентных штаммов *E. coli*. Впервые показана возможность регистрации воздействия бета-лактамовых антибиотиков на примере амоксициллина на микробные клетки *E. coli* с помощью пьезоэлектрического резонатора с поперечным электри-

ческим полем. Полученные данные являются перспективными для развития нового экспресс-метода определения антибактериальной активности антибиотиков.

При этом анализ проводится в жидкой фазе без иммобилизации антибиотиков на поверхности пьезоэлектрика. Преимуществами метода электроакустического анализа для решения указанной проблемы являются высокая чувствительность, высокая точность измерений (в пределах  $\pm 2\%$ ) и короткое время проведения анализа (в пределах 10 мин). Следует отметить, что с помощью стандартных микробиологических методов результат высева и определение ингибирующего действия антибиотиков получают не ранее чем через 18–20 ч.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты №№ 16-07-00818 и 16-07-00821).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Antibiotic Resistance Protocols*, Ed. by S. H. Gillespie and T. D. McHugh, 2<sup>nd</sup> ed. (Methods in Molecular Biology, vol. 642) (Springer Science + Business Media, LLC, 2010).
2. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; ninth informational supplement M100-S9* (NCCLS, 1999), Vol. 19, N. 1.
3. Methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. EUCAST Definitive document, Clin. Microbiol. Infect. **4**, 291 (1998).
4. М. В. Сухорукова, Клинический микробиологический журнал. **15** (3), 219 (2013).
5. S. J. Cavalieri, J. R. Biehle, and W. E. Sanders, Jr., Antimicrob. Agents Chemother. **39**, 1542 (1995).
6. S. Fleschin, C. Bala, A. A. Bunaciu, et al., Prep. Biochem. Biotechnol. **28**, 261 (1998).
7. E. Galindo, F. Lagunas, J. Osuna, et al., Enzyme Microb. Technol. **23** (5), 331 (1998).
8. J. C. Palomino, A. Martin, M. Camacho, et al., Antimicrob. Agents Chemother. **46**, 2720 (2002).
9. A. H. Diacon, J. S. Maritz, A. Venter, et al., Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **29**, 1561 (2010).
10. C. C. Boehme, P. Nabeta, D. Hillemann, et al., N. Engl. J. Med. **363**, 1005 (2010).
11. G. Longo, L. Alonso-Sarduy, R. L. Marques, et al., Nat. Nanotechnol. **8** (7), 522 (2013).
12. Т. Н. Ермолаева, Е. Н. Калмыкова и О. Ю. Шашканова, Рос. хим. журн. (Журн. Рос. хим. о-ва им. Д.И. Менделеева) **52** (2), 17 (2008).
13. Y. W. Kim, M. T. Meyer, A. Berkovich, Sensors and Actuators A: Physical **238**, 140 (2016).
14. B. D. Zaitsev, I. E. Kuznetsova, A. M. Shikhabudinov, et al., IEEE Trans. Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control. **59** (5), 963 (2012).

15. О. И. Гулий, Б. Д. Зайцев, И. Е. Кузнецова и др., *Микробиология* **82** (2), 218 (2013).
16. О. И. Гулий, Б. Д. Зайцев, И. Е. Кузнецова и др., *Биофизика* **57** (3), 460 (2012).
17. О. И. Гулий, Б. Д. Зайцев, И. Е. Кузнецова и др., *Биофизика* **60** (4), 722 (2015).
18. О. И. Гулий, Б. Д. Зайцев, И. А. Бородин и др., *Биофизика* **61** (4), 744 (2016).
19. Т. Маниатис, Э. Фрич и Д. Сэмбрук, *Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование* (Мир, М., 1984).
20. Б. Д. Зайцев, И. Е. Кузнецова, А. М. Шихабудинов и А. А. Васильев, *Письма в ЖТФ* **37** (11), 27 (2011).
21. Л. Е. Бриан, *Бактериальная резистентность и чувствительность к химиопрепаратам* (Медицина, М., 1984).
22. Н. С. Егоров, *Основы учения об антибиотиках* (Высш. шк., М., 1986).

## Electroacoustic Analysis for Determining the Effect of Amoxicillin on Microbial Cells

**O.I. Gulyi\* \*\*, B.D. Zaitsev\*\*\*, A.S. Semyonov\*\*\*, O.S. Larionova\*\*,  
O.A. Karavaeva\*, and I.A. Borodina\*\*\***

*\*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences,  
prosp. Entuzhiastov 13, Saratov, 410049 Russia*

*\*\*Saratov State Vavilov Agrarian University, Teatralnaya pl. 1, Saratov, 410012 Russia*

*\*\*\*Saratov Branch of Kotel'nikov Institute of Radio Engineering and Electronics, Russian Academy of Sciences,  
ul. Zelenaya 38, Saratov, 410019 Russia*

The possibility of determining the effects of amoxicillin, one of  $\beta$ -lactam antibiotics, on microbial cells of *Escherichia coli* by electroacoustic analysis method was shown for the first time. A piezoelectric resonator with transverse electric field with liquid container 1 ml was used as a biological sensor. It has been established that in the presence of amoxicillin the frequency dependence of real and imaginary parts of electrical impedance of the resonator loaded by a suspension of sensitive cells significantly differs from those of the resonator with a control of microbial cell suspension without an antibiotic. When the resonator is loaded by the amoxicillin-resistant cell suspension, these dependencies are virtually the same. The obtained results open prospects for the use of electroacoustic analysis methods to register the effect of  $\beta$ -lactam antibiotics on microbial cells and evaluate their antibacterial activity.

*Keywords: Escherichia coli, amoxicillin, electroacoustic analysis, piezoelectric cross-field excited resonator, antibacterial activity*