

*На правах рукописи*

**АЛСОВЭЙДИ АЛИ КАДХИМ МОХАММЕД**

**МИКРОБНЫЕ СЕНСОРНЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
АНТИБИОТИКОВ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ**

Специальность: 1.5.6. Биотехнология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Саратов – 2024

Диссертация выполнена в лаборатории биохимии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленного структурного подразделения ФГБУН Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук» (ИБФРМ РАН)

**Научный руководитель:** **Гулий Ольга Ивановна,**  
доктор биологических наук, профессор,  
ведущий научный сотрудник лаборатории  
биохимии ИБФРМ РАН

**Официальные  
оппоненты:** **Игнатов Сергей Георгиевич,**  
доктор биологических наук, заведующий  
лабораторией планетарной и исторической  
геокриологии Геологического факультета  
ФГБОУ ВО «Московский государственный  
университет имени М.В. Ломоносова»

**Рогачева Светлана Михайловна,**  
доктор биологических наук, профессор,  
заместитель руководителя по научной работе,  
заведующий кафедрой естественно-научных  
дисциплин Филиала частного учреждения  
образовательной организации высшего  
образования «Медицинский университет  
«Реавиз» в городе Саратов

**Ведущая организация:** ФГБУН «Федеральный исследовательский  
центр «Пушкинский научный центр  
биологических исследований Российской  
академии наук»

Защита диссертации состоится «24» апреля 2024 г. в 14:00 на заседании диссертационного совета диссертационного совета 35.2.030.09, созданного на базе ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева» по адресу: 127434, г. Москва, ул. Прянишникова, д. 19, тел: 8 (499) 976-17-14.

Юридический адрес для отправки почтовой корреспонденции (отзывов): 127434, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке им. Н.И. Железнова ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева» и на сайте [www.timacad.ru](http://www.timacad.ru)

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук, доцент

Киракосян Рима Нориковна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** На сегодняшний день антибактериальные препараты являются одной из наиболее широко используемых групп лекарственных средств на фармацевтическом рынке. Противомикробные препараты применяются в медицине, ветеринарии, пищевой промышленности при консервировании, для обработки пищевых продуктов при их транспортировке. В связи с повсеместным применением антибиотиков актуальной является проблема контроля их содержания в воде, жидкостях, продуктах питания, сточных водах фармацевтических предприятий и других объектах. Известны различные способы количественного определения антибиотиков, такие как микробиологические, спектрофотометрические, флуориметрические, хемилюминесцентные, различные варианты хроматографических методов, в том числе высокоэффективная жидкостная хроматография, хроматомасспектрометрия, инверсионная вольтамперометрия, электроаналитическое определение с модифицированными электродами (Methods for the determination, 1998; Сухорукова, 2013). Успешными для анализа антибиотиков являются биосенсорные методы. Биосенсоры - аналитические устройства, основой которых является биологический обнаруживающий элемент (биорецептор), интегрированный с физическим преобразователем (Purohit et al., 2020). 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 собой основу простых, чувствительных и быстродействующих сенсоров. Среди сенсорных систем особо выделяются акустические биосенсоры, чувствительным элементом которых являются бактерии. Преимуществом акустических биосенсоров является их способность проводить определение антибиотиков непосредственно в жидкости без предварительной иммобилизации анализируемых компонентов. Принцип действия таких датчиков основан на регистрации биоспецифических реакций в жидкой суспензии, контактирующей с поверхностью пьезоэлектрического звукопровода, по которому распространяется пьезоактивная акустическая волна. Методы электроакустического анализа биологических жидкостей и суспензий активно развиваются в последние два десятилетия, свидетельством чего является усовершенствование известных методов и появление новых подходов. В результате были разработаны акустические методы, позволяющие обнаруживать бактерии, вирусы и бактериофаги в жидких средах и оценивать их жизнеспособность. Однако до недавнего времени акустические датчики не применялись для анализа антибиотиков, и первое упоминание о возможности их применения для оценки воздействия антибактериальных препаратов на бактерии приведено в единственной работе (Gruhl, Lange, 2014). Поэтому актуальным является развитие методов определения антибиотиков на основе акустических сенсорных систем.

В качестве биоселективного компонента (элемента распознавания) сенсорной системы могут быть использованы антитела (Ат), специфичные к определяемому антигену. Альтернативным способом получения специфичных антител является технология фагового дисплея, в основе которой лежит экспонирование

чужеродных пептидов или белков на поверхности фаговых частиц в составе одного из химерных белков оболочки. Успех в применении фаговых антител в качестве сенсорного элемента датчика в значительной степени зависит от предварительной отработки метода их наработки и тестирования. Поэтому разработка методики получения антител, специфичных к антибиотикам с использованием технологии фагового дисплея, а также оценка возможности их применения для определения антибиотиков являются актуальными в современной биологии.

**Цель работы:** развитие новых подходов для определения антибиотиков на основе акустических сенсорных систем с использованием бактерий в качестве чувствительных элементов и метода дот-иммуноанализа с применением фаговых антител.

Для достижения поставленной цели в работе были поставлены следующие **задачи исследования:**

- Показать возможность определения канамицина и хлорамфеникола с помощью акустической сенсорной системы на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем.

- Оценить возможность определения чувствительности бактерий к канамицину путём регистрации аналитического сигнала датчика после воздействия антибиотика на бактерии.

- Отработать методику получения антиампициллиновых антител с использованием технологии фагового дисплея и оценить возможность их применения для определения ампициллина методом дот-иммуноанализа.

- Проверить специфичность антиампициллиновых фаговых антител в отношении других антибиотиков (тетрациклина и канамицина), а также близких по химической структуре к ампициллину веществ – L-фенилаланина, L-триптофана и L-цистеина.

#### **Научная новизна работы.**

Предложен новый метод определения канамицина и хлорамфеникола в жидкости с помощью биосенсорной тест-системы на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем.

Разработан новый подход для оценки чувствительности микробных клеток к антибиотикам на примере канамицина с помощью сенсорной системы на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем.

Впервые получены антиампициллиновые фаговые антитела и показана возможность их применения для определения ампициллина методом дот-иммуноанализа.

**Практическая значимость.** Представленные результаты демонстрируют возможность определения канамицина и хлорамфеникола в жидкости с помощью сенсорной тест-системы на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем.

Регистрация изменения аналитического сигнала сенсорной системы на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем в результате воздействия антибиотика на бактерии позволяет оценить их восприимчивость к исследуемому антибиотику.

На примере ампициллина отработана методика получения специфичных антител с использованием технологии фагового дисплея. Антиампициллиновые

фаговые антитела обладают специфичностью в отношении ампициллина и применимы для его определения методом дот-иммуноанализа с визуальным учетом результатов. Установлено, что антиампициллиновые фаговые антитела не взаимодействуют с тетрациклином, канамицином, L-фенилаланином, L-триптофаном и L-цистеином.

По материалам исследования разработано и издано учебное пособие для студентов старших курсов по определению хлорамфеникола с помощью сенсорной системы на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем.

#### **Теоретическая значимость.**

Показана перспективность применения акустической сенсорной системы на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем для определения антибиотиков.

Отработана методика получения антител, специфичных к ампициллину, с применением технологии фагового дисплея.

#### **Достоверность полученных результатов.**

Достоверность полученных результатов подтверждается тем, что экспериментальные исследования проводились на современном оборудовании с применением высокоточных аттестованных приборов. Результаты исследований антибиотиков, полученные с помощью электроакустических методов анализа, находились в соответствии с данными классических микробиологических методов анализа. Результаты работы неоднократно докладывались и обсуждались на всероссийских и международных конференциях, а также опубликованы в рецензируемых научных журналах.

**Методология и методы исследования.** Методологической базой послужили труды отечественных и зарубежных исследователей по вопросам определения антибиотиков в водных растворах. В качестве объекта исследования использовали микробные клетки *Escherichia coli* штаммов K-12 (IBPPM 204), XL-1 Blue (IBPPM 632), TG1, B-878, K-12 (pMMB33), pBR-325, антибактериальные препараты: ампициллин, канамицин, хлорамфеникол, полимиксин. В работе использовали хелперный бактериофаг M13K07 (Stratagene, Швеция). Для получения антител, специфичных к ампициллину, применяли овечью дисплейную библиотеку фрагментов scFv (Griffin.1, UK). Для развития методов анализа антибиотиков использовали сенсорные системы на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем. Для каждой серии экспериментов проводили не менее пяти измерений, а полученный фактический материал обрабатывался методами статистического анализа.

#### **Основные положения диссертации, выносимые на защиту:**

1. Микробная сенсорная тест-система на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем позволяет определить наличие канамицина и хлорамфеникола в жидкости.

2. Изменение величины регистрируемого сигнала датчика после воздействия канамицина на бактерии позволяет оценить их чувствительность к антибиотику.

3. Антиампициллиновые фаговые антитела позволяют выявлять ампициллин методом дот-иммуноанализа с визуальным учетом результатов.

**Апробация результатов исследования.** Результаты, полученные в ходе выполнения работы, представлены на 2-й и 3-й международной научной конференции PLAMIC2020 и PLAMIC2022 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» (Саратов, 2020; Санкт-Петербург, 2022), II и III Международной научной конференции «Исследования молодых учёных в биологии и экологии» (Саратов, 2021, 2022), национальной научно-практической конференции «Зыкинские чтения», посвященной памяти д.м.н., проф. Зыкина Л.Ф. (Саратов, 2021, 2022, 2023).

Работа выполнялась в лаборатории биохимии ИБФРМ РАН в соответствии с плановыми темами НИР «Выявление структурно-функциональных особенностей биополимеров и надмолекулярных комплексов ризосферных бактерий, детерминирующих образование ассоциативного симбиоза как формы адаптации к условиям обитания» (2019-2023 гг.), номер государственной регистрации № 121032300311-5.

Работа выполнена при частичной поддержке грантов РФФИ 19-07-00304 «Разработка новых принципов создания акустических биологических анализаторов нового поколения для быстрого определения концентрации и жизнеспособности бактериальных клеток в жидкой фазе для биосенсорных информационных систем» (2019-2021); РФФИ № 22-29-00587 «Акустические микробные сенсорные системы для определения антибиотиков в проводящих растворах» (2022-2023 гг.), РФФИ № 22-24-00417 «Разработка оптической тест-системы для анализа антибиотиков» (2022-2023 гг.).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 19 работ, в том числе 11 статей в научных изданиях, индексируемых международными базами данных, перечень которых определен в соответствии с рекомендациями ВАК РФ.

**Личный вклад соискателя.** Автор принимал непосредственное участие в планировании, подготовке и проведении экспериментальных исследований, анализе полученных результатов и их интерпретации, формулировке выводов, подготовке публикаций. Отдельные эксперименты или их этапы проводились совместно с коллегами из Саратовского филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института радиотехники и электроники (ИРЭ) им. В.А. Котельникова и ИБФРМ РАН.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы. Диссертация изложена на 106 страницах, включает 30 рисунков и 1 таблицу. Список литературы включает 155 источника, в том числе 145 из них зарубежных.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Обзор литературы** представлен критическим анализом научных публикаций по теме исследования, а также краткой информацией о масштабах применения антибактериальных препаратов в мире, важности развития методов их определения; основных методах определения антибиотиков, в том числе, с помощью биосенсорных систем.

**Объекты, материалы и методы исследования.** В работе использовали микробные клетки *E. coli* K-12 (IBPPM 204), XL-1 Blue (IBPPM 632), TG1, B-878, K-12 (pMMB33), pBR-325, предоставленные коллекцией ризосферных

микроорганизмов ИБФРМ РАН (<http://collection.ibppm.ru>). Культуры выращивали в условиях термостатирования ( $37\pm 1^\circ\text{C}$ ) при перемешивании (160 об/мин) до экспоненциальной фазы роста на жидкой среде LB, как описано в работе (Guliy *et al.*, 2022).

Методы. Электронно-микроскопический анализ, световую фазово-контрастную микроскопию, конфокальную лазерную сканирующую микроскопию проводили в Центре коллективного пользования научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии «Симбиоз» ИБФРМ РАН. Аффинную селекцию фагов библиотеки к ампициллину осуществляли согласно методу, описанному в работе (Charlton *et al.*, 2000). Специфичность и чувствительность антител определяли методом дот-анализа, титр антител определяли методом иммуноферментного анализа (Beatty *et al.*, 1987). Изучение воздействия антибиотиков на микробные клетки проводили методом электроакустического анализа согласно методике, описанной в работе (Guliy *et al.*, 2022). Все эксперименты по регистрации частотных зависимостей реальной и мнимой частей электрического импеданса резонатора при воздействии антибиотиков проводили с помощью датчика на основе резонатора с поперечным электрическим полем согласно методике, описанной Б.Д. Зайцевым с соавт. (Зайцев с соавт., 2011). Измерения величины электрического импеданса датчика проводили с помощью прецизионного измерителя LCR параметров Agilent 4285A (США), использовали также портативный компактный анализатор на основе резонатора с поперечным электрическим полем, совмещенный с персональным компьютером. В этом случае аналитическим сигналом служил модуль электрического импеданса резонатора. Используемые в работе датчики разработаны в лаборатории физической акустики Саратовского филиала ИРЭ им. В.А. Котельникова, на базе которой совместно были проведены все эксперименты с указанными датчиками. Кривые на рисунках строились по средним значениям, полученным в результате не менее 5 измерений, поскольку данные получены при измерении более чем 1000 точек, при демонстрации графиков планки погрешностей (около 2%) не видны. Анализ и представление данных осуществляли при помощи программы Microsoft Excel 2010 и стандартных методов статистической обработки.

### **Сенсорная система на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем для анализа канамицина**

Одним из антибиотиков, который широко применяется не только для лечения, но и в качестве стимулятора роста животных и в кормовых добавках для профилактики заболеваний, является канамицин (Durante-Mangoni *et al.*, 2009). Канамицин может накапливаться в организме человека и характеризуется потенциальной ототоксичностью и нефротоксичностью (Jiang *et al.*, 2017; Shavit *et al.*, 2017). Поэтому разработка методов для определения канамицина весьма актуальна. В результате предварительных исследований (Бородина с соавт., 2021; Гулий с соавт., 2020) для определения канамицина был выбран датчик на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем и микробные клетки, проявляющие чувствительность к канамицину. Эксперименты, проведенные с различными образцами проводящей и вязкой жидкости, показали,

что этот датчик характеризуется высокой чувствительностью к изменению параметров жидкости и полученные результаты отличаются хорошей повторяемостью. Такой датчик чувствителен к контактирующей жидкости и реагирует на изменение, как механических, так и электрических ее свойств. Идея экспериментов заключалась в оценке воздействия канамицина на бактерии с помощью указанного датчика и сравнении полученных данных с результатами стандартного микробиологического посева и микроскопии. Общая схема используемого датчика и план проведения экспериментов представлены на рис. 1.

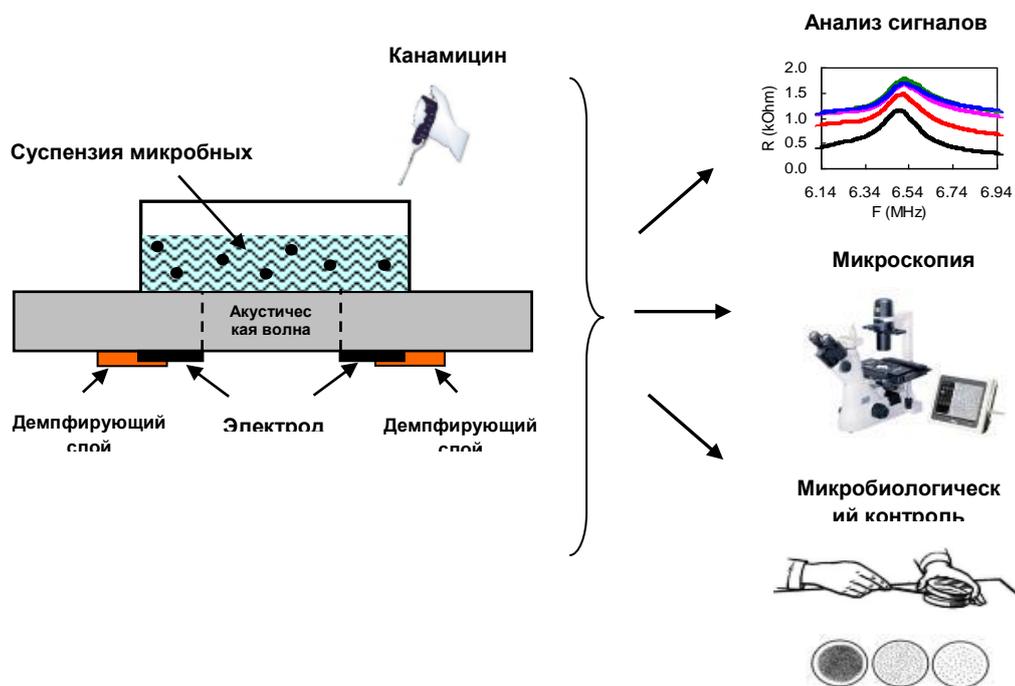


Рисунок 1. Общая схема используемого датчика и план проведения экспериментов

Воздействие разных концентраций канамицина на бактериальные клетки оценивали путем регистрации изменений реальной и мнимой частей электрического импеданса резонатора до и после воздействия антибиотика. В качестве контроля использовали указанные значения импеданса до обработки клеток антибактериальным препаратом.

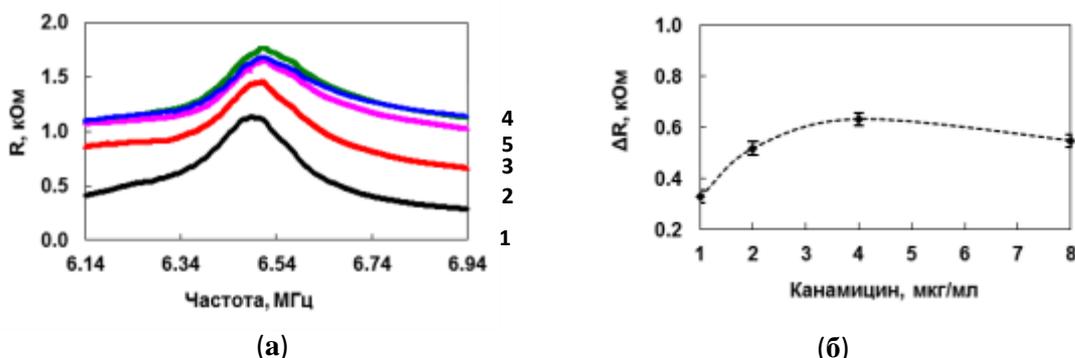


Рисунок 2. (а) Частотные зависимости реальной  $R$  части электрического импеданса для суспензии клеток после воздействия разных концентраций канамицина: 1 — без воздействия антибиотика; после воздействия канамицина: 2 — 0.5 мкг/мл; 3 — 1 мкг/мл; 4 — 2 мкг/мл; 5 — 4 мкг/мл. (б) Зависимость изменения реальной  $\Delta R$  части электрического импеданса на частоте 6,5 МГц от концентрации канамицина

На рис. 2 в качестве примера представлены частотные зависимости реальной  $R$  части электрического импеданса для суспензии клеток после воздействия разных концентраций канамицина.

Из данных, представленных на рис. 2а видно, что с увеличением удельного количества вносимого антибиотика к суспензии клеток изменение реальной части импеданса сначала растет и достигает максимального значения при концентрации антибиотика 4 мкг/мл, а затем немного уменьшается для концентрации - 8 мкг/мл. Для исключения массовой нагрузки на датчик, связанной с внесением антибиотика в измерительную ячейку и возможной его сорбцией на поверхности датчика, проведены эксперименты, в которых канамицин добавляли в измерительную ячейку с дистиллированной водой (без внесения бактериальных клеток). Установлено, что регистрируемые параметры датчика в этом случае практически не меняются.

В результате проведенных исследований выбрано оптимальное время для проведения анализа при обнаружении канамицина в образце, которое составляет не более 10 мин.

Для подтверждения активности канамицина в отношении изучаемых бактерий, проводили анализ их жизнеспособности с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (рис. 3) с окрашиванием LIVE/DEAD BacLight™: живые (зеленое окрашивание) / мертвые (красное окрашивание) клетки.

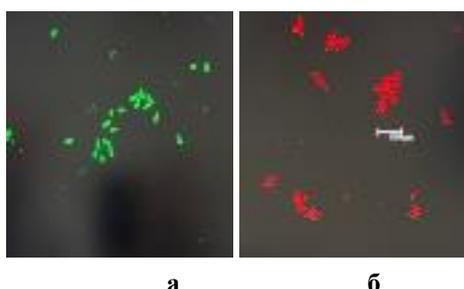


Рисунок 3. Изображения микробных клеток, полученные с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии до (а) и после (б) обработки канамицином

Из представленных данных видно, что после воздействия на бактерии канамицина (8 мкг/мл) клетки окрашиваются в красный цвет (рис. 3б), что свидетельствует о повреждении мембраны (клетки считаются мертвыми или умирающими) по сравнению с контролем – жизнеспособные клетки (окрашивание в зеленый цвет) (рис. 3а). Полученные данные согласуются с результатами аналогичных экспериментов при использовании акустического датчика.

Результаты являются перспективными для развития микробной сенсорной тест-системы для определения канамицина с нижним пределом детекции 1.0 мкг/мл. Установлено, что в качестве аналитического сигнала нужно использовать изменение регистрируемого сигнала датчика до и после внесения канамицина в суспензию с бактериями.

## **Экспресс-анализ воздействия аминогликозидов на бактерии с помощью сенсорной системы на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем**

В основе эффективного действия антибактериальных препаратов лежит высокая чувствительность к ним микробных клеток. Основной целью определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам является прогнозирование их эффективности при лечении инфекций. Поэтому определение антимикробной восприимчивости бактерий является одной из основных задач при антибиотикотерапии.

Проводили сравнительный анализ регистрируемых параметров датчика после воздействия канамицина на микробные клетки *E. coli* штаммов (XL-1, В-878, К-12 (pММВ33)), различающиеся по устойчивости к изучаемому антибиотику. Полученные данные сравнивали с результатами стандартного микробиологического высева. Поскольку ранее зафиксировано максимальное значение  $\Delta R$  при концентрации канамицина 4 мкг/мл, в дальнейших исследованиях использовали данную концентрацию антибиотика. В предварительных экспериментах установлено, что оптимальное время воздействия канамицина на бактерии (т.е. время для регистрации аналитического сигнала) составляет  $\sim 7 - 9$  мин. На рис. 4 в качестве примера представлены результаты изменения регистрируемых параметров датчика при добавлении канамицина к суспензии *E. coli* штамма В-878 (чувствительного к канамицину) (рис. 4а) и канамицинустойчивого штамма *E. coli* К-12 (pММВ33), обладающего плазмидой pММВ33, несущей устойчивость к канамицину (рис. 4б).

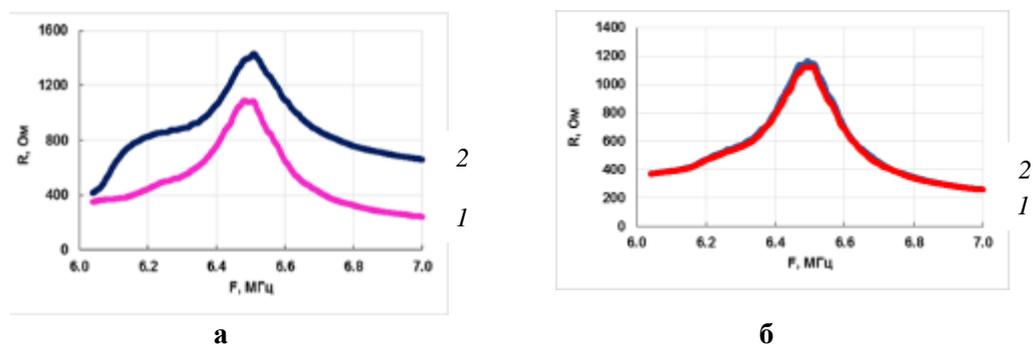


Рисунок 4. Частотные зависимости реальной  $\Delta R$  части электрического импеданса для суспензии клеток, чувствительного (а) и устойчивого (б) штамма к канамицину до (1) и после (2) воздействия антибиотика

Видно, что для чувствительного штамма зафиксированы значительные изменения регистрируемых параметров датчика, при этом на частоте 6.65 МГц, близкой к частоте резонанса,  $\Delta R$  оказывается равным 418 Ом.

На основании проведенных исследований установлено, что для определения критерия чувствительности бактерий к канамицину необходимо принимать во внимание изменение регистрируемого сигнала датчика на величину не менее 3% при воздействии канамицина по сравнению с контролем (клетки без воздействия антибиотика). Также для увеличения надежности следует учитывать не одну резонансную частоту, а набор частот в определенном диапазоне вблизи резонанса.

Таким образом, регистрируя изменения реальной или мнимой части электрического импеданса суспензии клеток после воздействия на нее канамицина,

можно сделать вывод о чувствительности/устойчивости изучаемых бактерий к исследуемому антибиотику.

### ***Компактный акустический анализатор на основе резонатора с поперечным электрическим полем для определения антибиотиков***

В предыдущих разделах показана возможность анализа антибиотиков на примере канамицина непосредственно в жидкости с помощью датчика на основе резонатора с поперечным возбуждающим электрическим полем. Хотя сам датчик обладает небольшими размерами (60×40×20 мм), для измерения параметров жидкости с его помощью использовался прецизионный LCR измеритель 4285А, который обладает высокой точностью (до 0.1 %), но весьма дорогой и громоздкий. Более перспективными являются компактные анализаторы, позволяющие проводить измерения биологических объектов в «полевых условиях» или небольших передвижных лабораториях. Поэтому в Саратовском филиале ИРЭ им. В.А. Котельникова (лаборатория физической акустики) был создан прибор, обладающий несколько меньшей точностью, но отличающийся простотой изготовления, портативностью и низкой стоимостью. Целью данного этапа работы заключалась в исследовании возможности использования разработанного компактного акустического анализатора для анализа антибиотиков в водной среде.

Условия проведения эксперимента были аналогичны, как и при использовании пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем. В качестве чувствительного элемента датчика использовали те же канамицинчувствительные бактерии. Установлено, что во всем используемом диапазоне концентраций антибиотика наблюдались изменения регистрируемых параметров датчика. Время регистрации аналитического сигнала составляло не более 5 мин. На основе полученных данных для всех используемых концентраций канамицина построены зависимости изменения величины модуля электрического импеданса ( $\Delta Z$ ) от концентрации канамицина на частоте 6.65 МГц. Установлено, что линейная зависимость находится в интервале концентраций антибиотика 0.5-2.5 мкг/мл. Таким образом, компактный акустический датчик может быть использован для определения канамицина в водных растворах.

Одним из важных моментов при развитии сенсорной системы для анализа антибиотиков является ее апробация на других группах антибиотиков. Поэтому на следующем этапе работы проводили исследования на компактном датчике для определения хлорамфеникола. Хлорамфеникол или левомецетин (класс Амфениколы) является антибиотиком ароматической структуры, широкого спектра действия (Pooja Shukla *et al.*, 2011), препарат активно используется не только в медицине, но и в животноводстве. Согласно данным Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов хлорамфеникол относится к категории С, что требует осторожности при его применении (Abdollahi *et al.*, 2014), поскольку характеризуется высокой токсичностью (Pooja Shukla *et al.*, 2011; Wiest *et al.*, 2012). Использование хлорамфеникола, а также несовершенство систем его детекции и очистки сточных вод предприятий различного профиля приводит к крупномасштабному загрязнению природных объектов и экосистем данным соединением и его производными, что значительно ухудшает санитарно-

гигиеническое состояние окружающей среды, особенно водных ресурсов. Основная опасность хлорамфеникола заключается в том, что после попадания в окружающую среду он не разлагается в краткосрочной перспективе, что приводит к длительному загрязнению им окружающей среды (Hanekamp *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2013).

При проведении исследований на компактном акустическом анализаторе, общий вид которого представлен на рис. 5, показано, что при добавлении хлорамфеникола к суспензии микробных клеток наблюдалось изменение регистрируемых параметров датчика уже при минимальной используемой концентрации хлорамфеникола в образце (0.5 мкг/мл). Полученные данные позволяют построить зависимости изменения величины модуля электрического импеданса ( $\Delta Z$ ) от концентрации хлорамфеникола. На рис. 6 представлена зависимость  $\Delta Z$  от концентрации хлорамфеникола на частоте 6.65 МГц при добавлении этого антибиотика к суспензии микробных клеток.

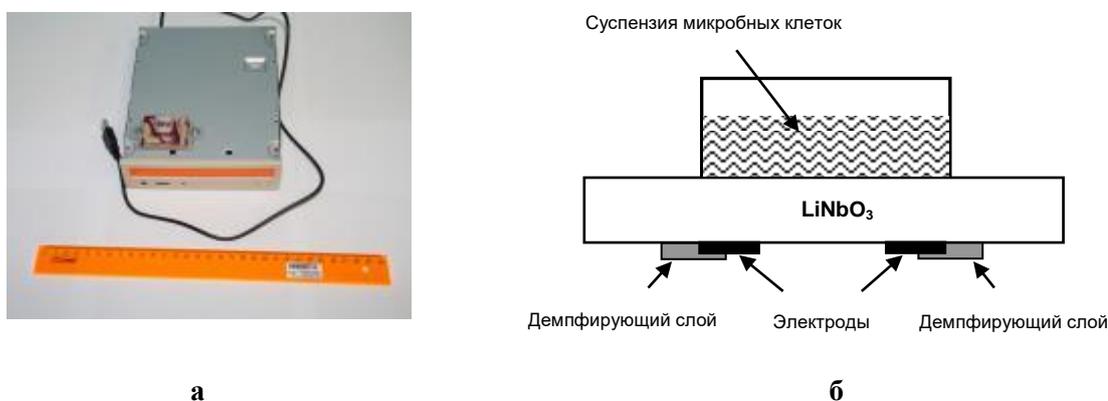


Рисунок 5. Компактный акустический анализатор для анализа антибиотика в водных растворах (а); датчик на основе резонатора с поперечным электрическим полем с жидкостным контейнером (б)

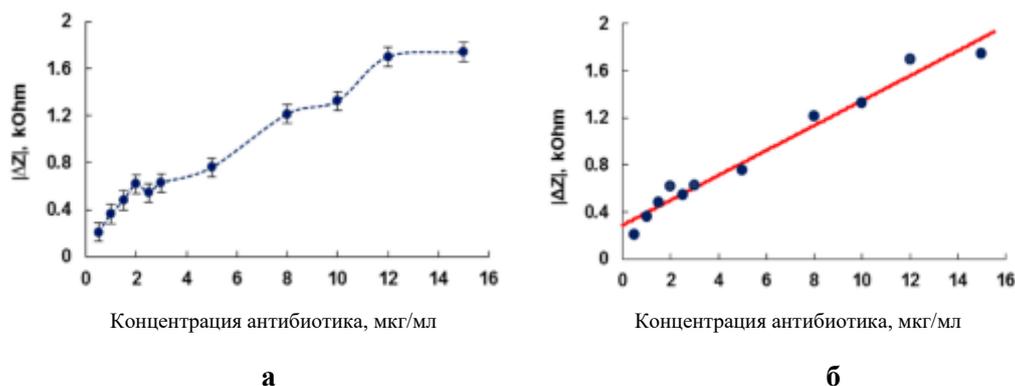


Рисунок 6. Зависимость изменения модуля электрического импеданса  $\Delta Z$  на частоте 6.65 МГц от концентрации хлорамфеникола при его добавлении к суспензии микробных клеток *E. coli* K-12 (а) и концентрационная кривая (б)

Видно, что с увеличением удельного количества вносимого антибиотика в клеточную суспензию изменение модуля электрического импеданса растет, достигает максимального значения при концентрации антибиотика 12 мкг/мл, а затем испытывает насыщения при концентрации антибиотика 15 мкг/мл.

Линейная зависимость, представленная на рис. 6б, может быть выражена уравнением:  $|\Delta Z| = 0.289 + 0.106n$ , (1),

где  $|\Delta Z|$  — изменение модуля электрического импеданса после добавления антибиотика (кОм),  $n$  — концентрация антибиотика (мкг/мл). Отсюда, измеряя изменение модуля электрического импеданса  $|\Delta Z|$ , можно определить  $n$  как

$$n = \frac{|\Delta Z| - 0.289}{0.106}, \quad (2)$$

Проведены независимые контрольные эксперименты по определению концентрации антибиотика с использованием калибровочной кривой, приведенной на рис. 6б, и описанной уравнениями (1, 2). Для этого были изготовлены три пробы раствора хлорамфеникола с разной концентрацией и с каждой пробой проведено 5 независимых экспериментов. Результаты представлены в таблице 1. Согласно предварительно проведенным исследованиям, квадратичная погрешность одного измерения модуля импеданса  $|\Delta Z|$  для каждого эксперимента не должна превышать 2%. Что касается концентрации  $n$  хлорамфеникола, определенной по градуировке уравнения (2), квадратичные ошибки одного измерения составляют 3.76, 2 и 2.1 % для концентраций 4.53, 7.02 и 9.01 мкг/мл. Таким образом, ошибка одного измерения концентрации антибиотика не превышает 4%, т.е. результаты лежат в пределах 4 %.

Таблица 1. Результаты независимых экспериментов по измерению концентрации хлорамфеникола с использованием калибровочной кривой на рисунке 6б.

$ \Delta Z $ , kHz	$ \Delta Z_{av} $ , kHz	$n$ , $\mu\text{g}/\text{мл}$	$n_{av}$ , $\mu\text{g}/\text{мл}$	$\Delta n_{av}$ , $\mu\text{g}/\text{мл}$	$Sq$ , $\mu\text{g}/\text{мл}$	Res1	Res5
0.764	0.764±1.6%	4.5	4.534	0.034	0.17	4.534±0.17 4.534±3.76%	4.534±0.08 4.52±1.7%
0.779		4.79		-0.256			
0.749		4.35		0.184			
0.771		4.6		-0.066			
0.756		4.43		0.104			
1.028	1.022±1.75%	7	7.02	0.02	0.135	7.02±0.135 7.02±2%	7.02±0.06 7.02±0.91%
1.05		7.2		-0.18			
1.009		6.85		0.17			
1.039		7.1		-0.08			
1.019		6.95		0.07			
1.241	1.24±1.5%	9.05	9.01	-0.04	0.192	9.01±0.192 9.01±2.1%	9.01±0.09 9.01±0.95%
1.264		9.25		-0.24			
1.215		8.75		0.26			
1.252		9.1		-0.09			
1.227		8.9		0.11			

Примечания: Здесь введены следующие обозначения:  $|\Delta Z|$  – модуль импеданса резонатора;  $|\Delta Z_{cp}|$  – усредненный модуль импеданса резонатора;  $n$  – концентрация хлорамфеникола;  $n_{cp}$  – усредненное значение концентрации хлорамфеникола;  $\Delta n_{cp}$  – отклонение от  $n_{cp}$ ;  $Sq$  — квадратичная ошибка одного измерения; Res1 является результатом одного измерения; Res5 – результат пяти измерений.

Для исключения массовой нагрузки на датчик, связанной с внесением антибиотика в измерительную ячейку и возможной его сорбцией на поверхности датчика, проведены дополнительные эксперименты, в которых хлорамфеникол добавляли в измерительную ячейку с дистиллированной водой (без внесения бактериальных клеток). Показано, что изменение массы воды (до 50 мкл) после внесения антибиотика не приводит к изменению модуля электрического сопротивления резонатора.

Таким образом, показана возможность применения компактного акустического анализатора с использованием микробных клеток, чувствительных к хлорамфениколу, в качестве сенсорного элемента для определения хлорамфеникола в водных средах с нижним пределом детекции 0.5 мкг/мл и оценки антибактериальной активности.

### ***Фаговые антитела для определения ампициллина***

Одной из важных составляющих при разработке диагностических аналитических систем для анализа антибактериальных препаратов является подбор биоселективного агента. В качестве биоселективного агента (элемента распознавания) преимущественно используют антитела. Не менее востребованной является технология фагового дисплея для получения антител, специфичных к низкомолекулярным антигенам, в том числе, антибиотикам. С применением овечьей дисплейной библиотеки фрагментов scFv (Griffin.1, UK) отработана методика получения антител, специфичных к ампициллину. Выбор ампициллина, как представителя  $\beta$ -лактамовых антибиотиков, обусловлен тем, что данная группа препаратов занимает 2-е место по объему продаж среди всех антибиотиков и важно разрабатывать методы их контроля в окружающей среде. Возможность применения фаговых антител для определения ампициллина проводили методом дот-иммуноанализа. Несмотря на то, что метод дот-иммуноанализа, в основном, качественный или полуколичественный метод, его использование может оказывать большую помощь при предварительном тестировании антител. Суть метода заключается в визуализации специфического взаимодействия адсорбированного на мембране антигена и меченых (коллоидными или молекулярными метками) антител. В работе использовали стратегию вторичного мечения, как описано в работе (Staroverov *et al.*, 2015). Сначала проводили биоспецифическую реакцию ампициллин/фаговые антитела, а затем визуализовали ее с помощью меченых наночастицами поликлональных кроличьих антифаговых антител. Установлено, что для повышения чувствительности фаговых антител необходимо проводить не менее 4-х раундов селекции. Методом дот-иммуноанализа при биоспецифическом взаимодействии отобранных фаговых антител проведено определение ампициллина в водных растворах и показано, что метод твердофазного иммуноанализа с визуальным учетом результатов, позволяет определять минимальную концентрацию ампициллина в воде 1 мкг/мл (рис. 7).

На следующем этапе проводили анализ специфичности взаимодействия полученных антиампициллиновых фаговых антител в отношении представителей других групп антибиотиков: тетрациклина (занимает 1 место по объему продаж) и канамицина (как представителя аминогликозидных антибиотиков, объем продаж

которого составляет 6.2% от всех реализуемых антибактериальных препаратов) (European Medicines Agency, European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption, 2021. 'Sales of Veterinary Antimicrobial Agents in 31 European Countries in 2019 and 2020'. (EMA/58183/2021).

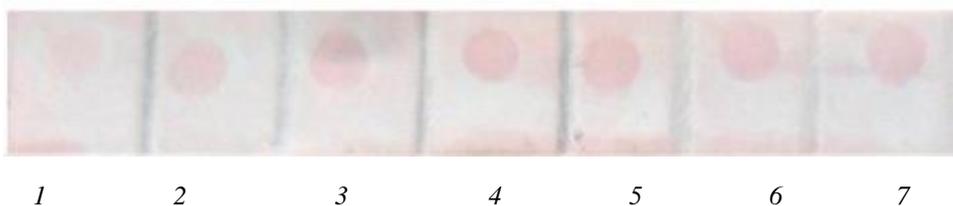


Рисунок 7. Дот-иммуноанализ фаговых антител, специфичных к ампициллину после 4 раунда селекции при определении ампициллина в концентрации: 1-1.0; 2 – 4.0; 3 – 6.0; 4 – 12; 5 – 25; 6 – 50; 7 – 100 мкг/мл

Условия проведения анализа для всех антибиотиков были аналогичны. Установлено, что конъюгат связывался с комплексом ампициллин (антиген) – специфичные фаговые антитела, что можно визуально наблюдать в виде серии розовых пятен (рис. 8). Из представленных данных видно, что полученные нами фаговые антитела, специфичны только к ампициллину и не взаимодействуют с тетрациклином и канамицином.

Поскольку химическая формула ампициллина, L-фенилаланина и L-триптофана содержат ароматическое кольцо и группу  $\text{NH}_2$  (рис. 9), были проведены контрольные исследования по исключению возможности неспецифического взаимодействия полученных фаговых антител с L-фенилаланином и L-триптофаном.

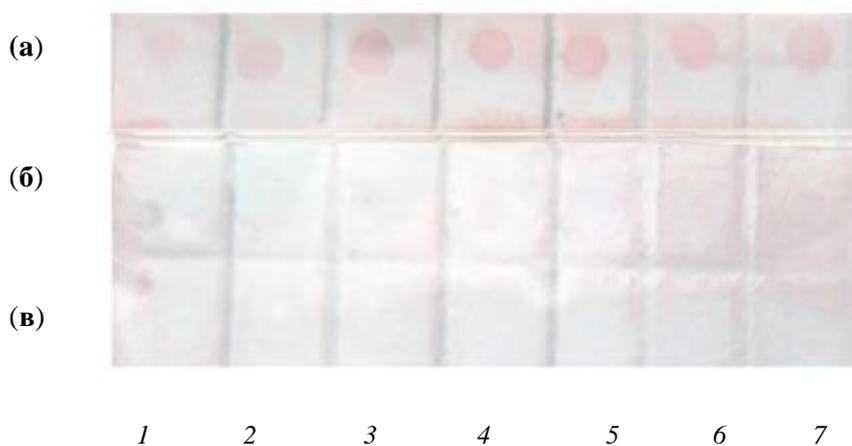


Рисунок 8. Специфичность фаговых антител в отношении ампициллина (а, мкг/мл), тетрациклина (б, мкг/мл), канамицина (в, мкг/мл) методом дот-иммуноанализа при их концентрации: 1-1.0; 2 – 4.0; 3 – 6.0; 4 – 12; 5 – 25; 6 – 50; 7 – 100 мкг/мл

Дополнительно проводили исследования, исключая неспецифическое взаимодействие фаговых антител в отношении L-цистеина, который также в своем составе содержит группу  $\text{NH}_2$  (рис. 9).

Из результатов, представленных на рис. 10, видно, что фаговые антитела, специфичные в отношении ампициллина, не взаимодействуют с L-фенилаланином, L-триптофаном и L-цистеином. Как показало исследование, технология фагового

дисплея является перспективным инструментом для получения антител, специфичных к ампициллину. Полученные фаговые антитела обладают достаточно высокой специфичностью по отношению к ампициллину и не взаимодействуют с другими антибиотиками: тетрациклином и канамицином, а также аминокислотами: L-фенилаланином, L-триптофаном и L-цистеином. Рекомендовано проводить не менее 4 раундов биопэннинга для получения фаговых антител, специфичных к ампициллину.

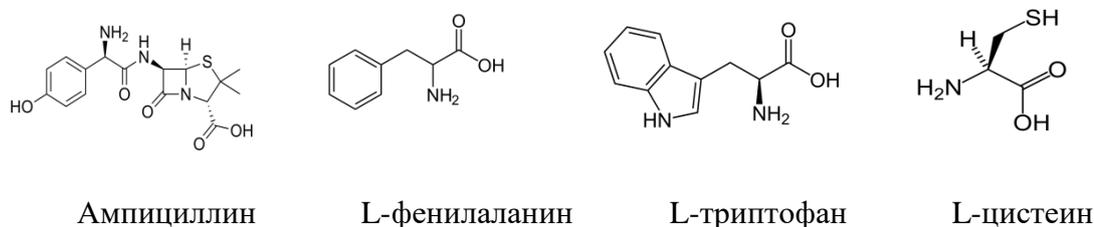


Рисунок 9. Структурные формулы ампициллина, L-фенилаланина, L-триптофана и L-цистеина

Фаговые антитела, специфичные к ампициллину, в дальнейшем могут быть использованы для определения ампициллина в водных растворах методом дот-иммуноанализа (нижний предел детекции составлял 1 мкг/мл).

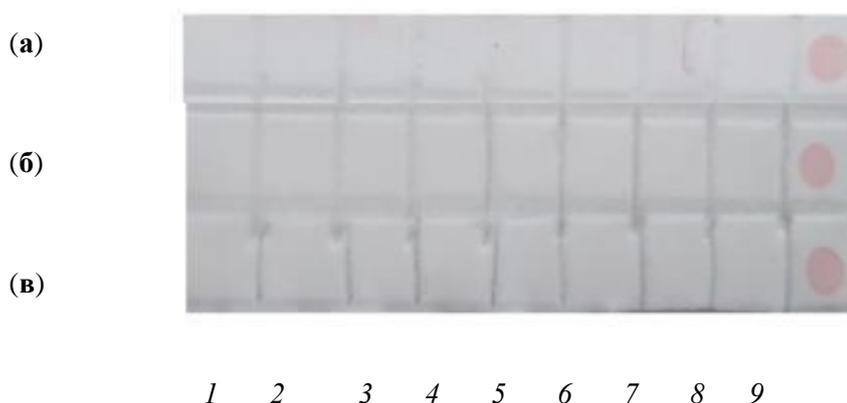


Рисунок 10. Анализ взаимодействия фаговых антител, специфичных в отношении ампициллина (100 мкг/мл), с L-триптофаном (а), L-фенилаланином (б) и L-цистеином (в) методом дот-иммуноанализа: при их концентрации (мкг/мл): 1-1.0; 2 – 4.0; 3 – 6.0; 4 - 12; 5 – 25; 6 – 50; 7 – 100; 8 – 1000; 9 – контроль

На данном этапе показана возможность получения фаговых антител, специфичных к ампициллину, и продемонстрирована принципиальная возможность их применения для иммунодетекции ампициллина. В дальнейшем такие фаговые антитела могут быть использованы в качестве чувствительного (распознающего) компонента сенсорных систем при определении ампициллина в водных растворах.

### Заключение

Использование акустических датчиков позволило показать перспективность акустической сенсорной системы на основе резонатора с поперечным

электрическим полем и компактного акустического анализатора на основе резонатора с поперечным электрическим полем для определения антибиотиков (канамицина и хлорамфеникола) в водных растворах.

Применение технологии фагового дисплея позволило получить антитела, специфичные к ампициллину. Антиампициллиновые фаговые антитела показали высокую специфичность в отношении ампициллина.

### **Практические рекомендации**

Предлагаемые сенсорные методы могут быть реализованы для определения антибактериальных препаратов в водных растворах.

Антиампициллиновые фаговые антитела могут быть использованы для детекции ампициллина в водных растворах методом дот-иммуноанализа.

### **Перспективы дальнейшей разработки темы**

В перспективе исследования будут направлены на апробацию и оптимизацию методов определения антибиотиков с помощью разработанных сенсорных систем на других группах антибиотиков, а также в условиях, приближенных к реальным образцам и в реальных образцах.

Антиампициллиновые антитела, полученные с помощью технологии фагового дисплея, потенциально могут быть использованы в качестве чувствительного (распознающего) компонента определения ампициллина в водных растворах. Отработанная технология может служить основой для наработки антител, специфичных к другим группам антибиотиков.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

1. Акустическая микробная тест-система на основе резонатора с поперечным электрическим полем позволяет проводить анализ канамицина и хлорамфеникола в водных растворах в режиме реального времени. При этом нижний предел детекции составляет 1.0 мкг/мл и 0.5 мкг/мл, соответственно.

2. Предложен новый подход для оценки чувствительности микробных клеток к антибиотикам на примере канамицина с помощью сенсорной системы на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем с диапазоном рабочих частот 6 – 7 МГц.

3. Применение технологии фагового дисплея позволило получить антитела, специфичные к ампициллину. Впервые показана возможность использования фаговых антител для определения ампициллина методом дот-иммуноанализа.

4. Показано, что антиампициллиновые фаговые антитела обладают специфичностью в отношении ампициллина и не взаимодействуют с тетрациклином, канамицином, L-фенилаланином, L-триптофаном и L-цистеином.

### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

#### **Научные статьи, опубликованные в изданиях, индексируемых в международных цитатно-аналитических базах данных:**

1. Гулий, О.И. Акустическая сенсорная система для определения бактерий в водной среде / О.И. Гулий, Б.Д. Зайцев, О.А. Караваева, Али Кадхим Мохаммед Алсовэйди, О.С. Ларионова, И.А. Бородина. – Текст: непосредственный //

Прикладная биохимия и микробиология. – 2020. – Т. 56, №5. – С. 514–520. DOI: 10.31857/S0555109920050074.

2. Гулий, О.И. Микробный датчик для определения активности амоксициллина / О.И. Гулий, Б.Д. Зайцев, А.В. Смирнов, О.А. Караваева, **Али Кадхим Мохаммед Алсовэйди**, О.С. Ларионова, И.А. Бородина. – Текст: непосредственный // Антибиотики и химиотерапия. – 2020. – №1-2. – С. 3–9. DOI: 10.1016/0235-2990-2020-65-1-2-3-9.

3. Гулий, О.И. Анализ антибактериальной активности амоксициллина биологическим датчиком с щелевой акустической волной / О.И. Гулий, Б.Д. Зайцев, О.С. Ларионова, **Али Кадхим Мохаммед Алсовэйди**, О.А. Караваева, А.М. Петерсон, И.А. Бородина. – Текст: непосредственный // Антибиотики и химиотерапия. – 2021. – Т. 66, №1–2. – 12-18. doi: 10.24411/0235-2990-2021-66-1–2-12-18.

4. Гулий, О.И. Биосенсорные системы для определения антибиотиков / О.И. Гулий, Б.Д. Зайцев, **Али Кадхим Мохаммед Алсовэйди**, О.А. Караваева, Л.Г. Ловцова, И.А. Бородина. – Текст: непосредственный // Биофизика. – 2021. – Т. 66, №4. – С. 657–667. DOI: 10.31857/S0006302921040050.

5. Бородина, И.А. Определение микробных клеток при их взаимодействии с фаговыми мини-антителами акустическим датчиком на основе резонатора с поперечным электрическим полем из пьезокерамики ЦТС-19 / И.А. Бородина, Б.Д. Зайцев, А.А. Теплых, **Али Кадхим Мохаммед Алсовэйди**, О.С. Ларионова, О.И. Гулий. – Текст: непосредственный // Известия РАН. Сер. физ. (Izvestia RAN. Seriya Fizicheskaya) – 2021. – Т. 85, № 6 – С. 771–776. DOI: 10.31857/S0367676521060065.

6. Guliy, O.I. Microbial acoustic sensor test-system based on a piezoelectric resonator with a lateral electric field for kanamycin detection in liquid / O.I. Guliy, B.D. Zaitsev, A.P. Semyonov, **Ali Kadhim Mohammed Alsowaidi**, A.A. Teplykh, O.A. Karavaeva, I.A. Borodina. – Текст: непосредственный // Ultrasonics. – 2022. – V. 120, – 106651. <https://doi.org/10.1016/j.ultras.2021.106651>.

7. Zaitsev B. Microbial acoustical analyzer for antibiotic indication / B. Zaitsev, I. Borodina, **Ali Kadhim Mohammed Alsowaidi**, O. Karavaeva, A. Teplykh, O. Guliy. – Текст: непосредственный// Sensors. – 2022. – V. 22. – P. 2937. <https://doi.org/10.3390/s22082937>.

8. **Алсовэйди, Али Кадхим Мохаммед**. Методы и подходы для определения антибиотиков / **Али Кадхим Мохаммед Алсовэйди**, О.А. Караваева, О.И. Гулий. – Текст: непосредственный // Антибиотики и химиотерапия. – 2022. – Т. 67, №1–2. – С. 53–61. doi: 10.37489/0235-2990-2022-67-1-2-53-61.

9. Гулий, О.И. Фаговые антитела как биорецепторы для определения ампициллина / О.И. Гулий, **Али Кадхим Мохаммед Алсовэйди**, А.С. Фомин, К.П. Габалов, С.А. Староверов, О.А. Караваева. – Текст: непосредственный // Прикладная биохимия и микробиология. – 2022. – Т. 58, №5. – С. 513–519. DOI: 10.31857/S0555109922050087.

10. Бородина, И.А. Биологический датчик на основе акустической щелевой моды с использованием микробных клеток для определения ампициллина / И.А. Бородина, Б.Д. Зайцев, **Али Кадхим Мохаммед Алсовэйди**, О.А. Караваева, О.И. Гулий. – Текст: непосредственный // Акустический журнал. – 2022. – Т. 68, №6. – С. 583–588.

11. Гулий, О.И. Экспресс анализ воздействия аминокгликозидов на бактерии с помощью сенсорной системы на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем / О.И. Гулий, Б.Д. Зайцев, **Али Кадхим Мохаммед Алсовэйди**, О.А. Караваева, А.П. Семёнов, И.А. Бородина. – Текст: непосредственный // Антибиотики и химиотерапия. – 2023. – Т. 68, № 1–2. – С. 4–10. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-1-2-4-10>.

**Работы, опубликованные в рецензируемых научных изданиях:**

12. **Алсовэйди, Али Кадхим Мохаммед**. Микробная сенсорная система для определения амоксициллина / **Али Кадхим Мохаммед Алсовэйди**, О.И. Гулий, Б.Д. Зайцев, О.А. Караваева, А.А. Хомякова, И.З. Шавишвили, О.Ю. Ксенофонтова, И.А. Бородина. – Текст: непосредственный // PLAMIC2020 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего»: материалы 2-ой Международной научной конференции, Саратов. 5–9 октября 2020 г. – С. 23.

13. Хомякова, А.А. Перспективы применения фаговых антител в качестве селективного рецептора биосенсоров / А.А. Хомякова, **Али Кадхим Мохаммед Алсовэйди**, А.М. Петерсон, О.И. Гулий. – Текст: непосредственный // Исследования молодых учёных в биологии и экологии: сборник научных статей, ООО «Амирит», Саратов, 2021. – С. 144–145.

14. Алсовэйди, А.К.М. Перспективы применения оптической сенсорной системы для определения антибиотиков / **Али Кадхим Мохаммед Алсовэйди**, В.В. Шардин, А.А. Хомякова, О.А. Караваева, М.В. Каневский, М.А. Бородина, О.С. Ларионова, О.И. Гулий. – Текст: непосредственный // «Зыкинские чтения»: материалы Национальной научно-практической конференции, посвященной памяти д.м.н., профессора Зыкина Л.Ф., Саратов, 28 апреля 2021. – С. 12–15.

15. Шардин, В. В. Отработка технологии фагового дисплея для получения специфичных к ампициллину антител / В.В. Шардин, **Али Кадхим Мохаммед Алсовэйди**, М.В. Каневский, О.А. Караваева, А.С. Фомин, С.А. Староверов, О.И. Гулий. – Текст: непосредственный // «Исследования молодых ученых в биологии и экологии: материалы III Международной научной конференции молодых ученых – 2022» 18.04.2022- 22.04.2022: сборник научных статей. – Саратов: Амирит, 2022. – 136 с. С. 120-121. ISBN 978-5-00140-996-0.

16. **Алсовэйди, Али Кадхим Мохаммед**. Разработка компактного акустического анализатора для определения канамицина / **Али Кадхим Мохаммед Алсовэйди**, В.В. Шардин, Б.Д. Зайцев, О.А. Караваева, М.В. Каневский, И.А. Бородина, О.И. Гулий – Текст: непосредственный // «Зыкинские чтения»: материалы Национальной научно-практической конференции, посвященной памяти д.м.н., профессора Зыкина Л.Ф., Саратов, 28 апреля 2022. – С. 3–6. ISBN 978-5-7011-0821-7.

17. Караваева, О.А. Перспективы применения акустического анализатора для определения левомицетина / О.А. Караваева, Б.Д. Зайцев, **Али Кадхим Мохаммед Алсовэйди**, И.А. Бородина, О.И. Гулий. - Текст: непосредственный // «Зыкинские чтения»: материалы Национальной научно-практической конференции, посвященной памяти д.м.н., профессора Зыкина Л.Ф., Саратов, 28 апреля 2022. – С. 101–107. ISBN 978-5-7011-0821-7.

18. Караваева, О.А. Определение канамицина с помощью микробного датчика на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем / О.А. Караваева, Б.Д. Зайцев, И.А. Бородина, А.П. Семёнов, **Али Кадхим Мохаммед Алсовэйди**, О.И. Гулий. - Текст: непосредственный // PLAMIC2022 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего»: сборник тезисов Третьей Международной научной конференции, Санкт-Петербург, 3–8 октября 2022. – С. 106. ISBN 978-5-6041302-2-3.

19. Евстигнеева, С.С. Отработка технологии фагового дисплея для получения антител, специфичных к антибактериальным препаратам / С.С. Евстигнеева, О.А. Караваева, **Али Кадхим Мохаммед Алсовэйди**, С.А. Староверов, А.С. Фомин, О.И. Гулий - Текст: непосредственный // PLAMIC2022 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего»: сборник тезисов Третьей Международной научной конференции, Санкт-Петербург, 3-8 октября 2022. – С. 87. ISBN 978-5-6041302-2-3.