

БИОСЕНСОРНЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ

© 2021 г. О.И. Гулий*, **, Б.Д. Зайцев***, А.К.М. Алсовэйд****, О.А. Караваева*,
Л.Г. Ловцова**, 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

****Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского,
410012, Саратов, ул. Астраханская, 83

E-mail: guliy_olga@mail.ru

Поступила в редакцию 15.01.2021 г.

После доработки 02.06.2021 г.

Принята к публикации 03.06.2021 г.

Антибиотики широко применяются в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности. Однако активное использование антибактериальных препаратов приводит к загрязнению окружающей среды. В связи с этим существует большая потребность в мониторинге и определении антибиотиков в различных средах, таких как питьевая вода, продукты питания, напитки, сточные воды фармацевтических предприятий и др. Для определения антибиотиков разработано достаточное количество методов, в том числе и на основе биосенсоров. Биосенсорные методы анализа имеют довольно широкое применение и являются неотъемлемой частью при экологическом мониторинге. Наиболее востребованными для анализа антибиотиков являются электрохимические, оптические, акустические, микробные биосенсоры, иммуно- и аптасенсоры, а также сенсоры на основе молекулярно-импринтированных полимеров. В статье приводится краткий обзор биосенсорных методов и подходов для определения антибиотиков. Проведен анализ наиболее перспективных биосенсорных систем при определении антибактериальных препаратов.

Ключевые слова: антибиотики, методы определения, биосенсоры, аптамеры, антитела, микробные клетки.

DOI: 10.31857/S0006302921040050

Антибактериальные препараты являются одной из наиболее широко используемых групп лекарственных средств на фармацевтическом рынке. Антибиотики широко применяются не только в медицине и ветеринарии, но и в пищевой промышленности при консервировании и обработке пищевых продуктов, а также их транспортировке [1].

Антибиотики в субтерапевтических дозах добавляют в корм животным для усиления их роста [2]. Анализ питьевой воды на наличие антибиотиков представляет особый интерес из-за возможности попадания потенциальных загрязнителей в круговорот воды. В связи с этим актуальным является проблема контроля содержания антибиотиков в лекарственных формах, а также их определение в жидкостях, в продуктах питания, сточных водах фармацевтических предприятий и

других объектах. Для обнаружения антибиотиков используют микробиологические, спектрофотометрические, флуориметрические, хемилюминесцентные, различные варианты хроматографических методов, в том числе высокоэффективную жидкостную хроматографию и хромато-масс-спектрометрию, инверсионную вольтамперометрию, электроаналитическое определение с модифицированными электродами [3], а также биосенсорные методы [4, 5]. Биосенсорные методы анализа активно развиваются в последнее время и являются неотъемлемой частью экологического мониторинга окружающей среды. В работе представлен краткий обзор биосенсорных систем для определения антибиотиков.

БИОСЕНСОРНЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ

Несмотря на значительное количество разработанных методов определения антибиотиков,

Сокращение: ППР — поверхностный плазмонный резонанс.

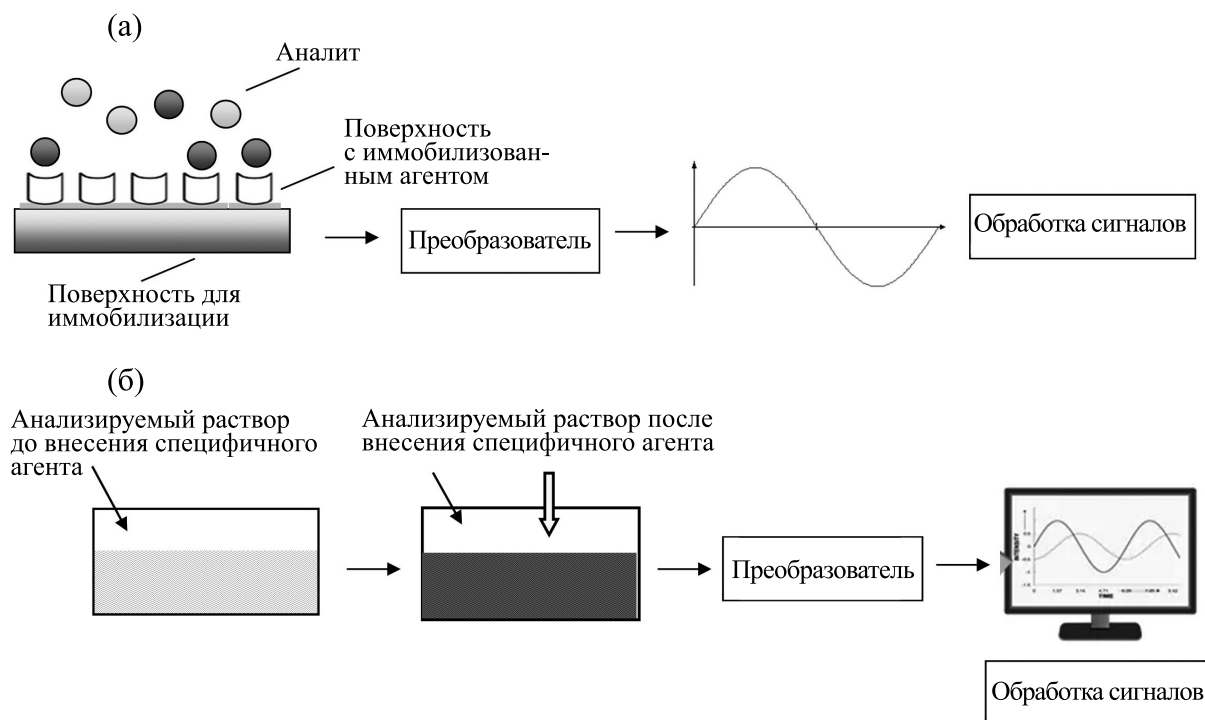


Рис. 1. Общая схема биосенсоров с иммобилизацией (а) и без иммобилизации (б) компонентов анализа.

одной из наиболее перспективных технологий для экспресс-анализа антибактериальных препаратов являются биосенсорные системы. Биосенсоры позволяют проводить качественный и количественный анализ антибиотиков, что делает их очень востребованными при необходимости крупномасштабного анализа антибактериальных препаратов. Однако биосенсоры имеют ряд ограничений, связанных как со стабильностью работы, так и с их стерилизацией после удаления отработанных образцов.

Биосенсоры представляют собой био-химико-физические системы, состоящие из двух компонентов: чувствительного биологического элемента и системы детекции, которые позволяют регистрировать концентрацию или активность различных аналитов, присутствующих в образце. Биологический элемент может быть каталитическим и некаталитическим. К каталитическим элементам можно отнести бактерии, ферменты и ткани. К некаталитическим элементам относятся рецепторы и нуклеиновые кислоты. Система детекции может быть оптической, калориметрической, акустической, электрической и др. Для определения антибиотиков применяются биосенсоры, обладающие различной конструкцией и механизмом действия. Ключевой и решающей задачей при разработке биосенсора является процесс введения и закрепления биорецептора на поверхности носителя (транзьюсера), т.е. процесс иммобилизации, позволяющий разработать

селективный, воспроизводимый, чувствительный, стабильный биосенсор [6, 7]. Поэтому существуют два варианта датчиков — датчики с иммобилизацией компонентов анализа на их поверхности и датчики, с помощью которых возможно проведение исследований непосредственно в жидкости, без иммобилизации компонентов анализа. Общая схема биосенсоров представлена на рис. 1.

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ БИОСЕНСОРЫ

Электрохимические биосенсоры создавались с целью объединения чувствительности электрохимического детектора и специфичности активного слоя. Среди электрохимических биосенсоров можно выделить следующие:

- потенциометрические сенсоры, в которых измеряется потенциал ячейки при нулевом токе [8];
- вольтамперометрические (или амперометрические) сенсоры, в которых измеряется ток окисления или восстановления электроактивных частиц, возникающий при приложении заданной разности потенциалов между электродами [9];
- кондуктометрические сенсоры, в которых измеряется электропроводность содержимого контейнера с помощью моста проводимостей [8, 9].

В биосенсорах электрохимического типа в сочетании с потенциометрическими или амперо-

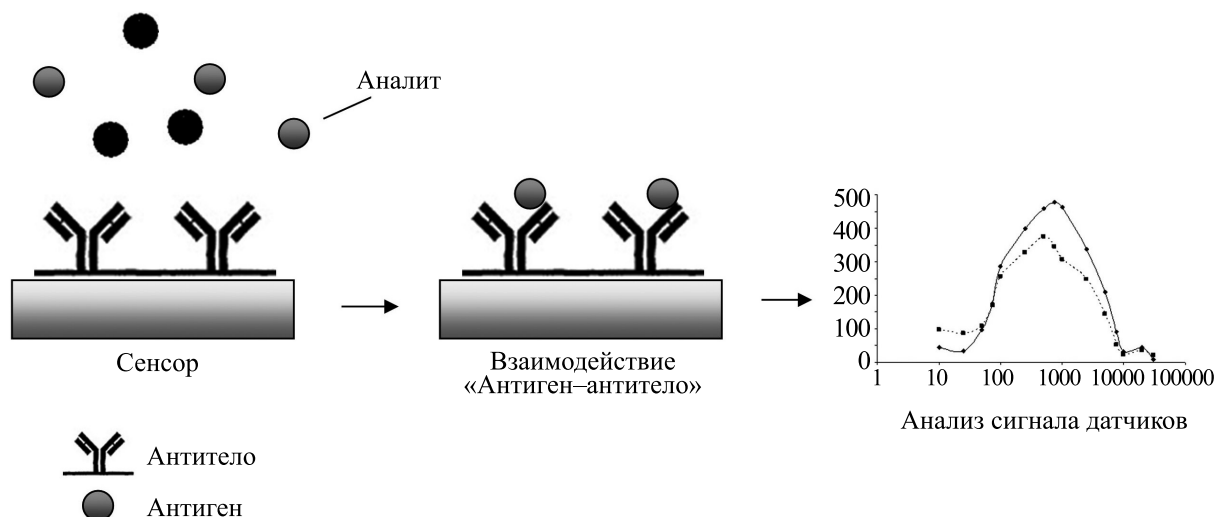


Рис. 2. Общая схема работы иммуносенсора.

метрическими электродами применяют ферменты, рецепторы, клетки микроорганизмов, ткани растений и животных, антитела, меченные ферментами.

Например, в работе [10] описаны возможности сенсоров на основе стеклоглеродного электрода и пленок хитозана для определения норфлоксацина в присутствии дофамина, кофеина и мочевой кислоты. Морфологические, структурные и электрохимические характеристики наноструктурированного материала оценивали с помощью спектрофотометрии, рентгеновской дифракции, просвечивающей электронной микроскопии и вольтамперометрии.

Другими авторами был разработан [11] электрохимический биосенсор на основе принципа аффинности для обнаружения остатков цефтиофура в образцах мяса с помощью спектроскопии электрохимического импеданса при времени анализа 15 мин.

ИММУНОСЕНСОРЫ

Самая большая группа биосенсоров, используемых для обнаружения антибиотиков, основана на использовании иммунохимических реакций биораспознавания — иммуносенсоры. Иммуносенсоры — это устройства, состоящие из специфического антигена/антитела, связанного с преобразователем и передатчиком сигнала о связывании соответствующего лиганда. Общая схема иммуносенсора представлена на рис. 2. В работе иммуносенсора в качестве определяемых соединений или распознающих молекул обязательно принимают участие антитела, которые иммобилизуются на сенсоре или вводятся в пробу при выполнении конкурентного формата анализа.

Для создания рецепторных покрытий иммуносенсоров используют различные по природе биологически активные вещества: гаптен-белковые конъюгаты (с белковыми молекулами связаны низкомолекулярные вещества, такие как салициловая кислота, сульфаниламиды, атразин, кокаин и др.), белки (антитела и рекомбинантные фрагменты антител); синтетические пептиды (например, HIV-пептид), липополисахариды, вирусы, клетки и т.д.

К наиболее часто применяемым иммуносенсорам относятся электрохимический и оптический. Последним чаще всего является биосенсор с использованием поверхностного плазмонного резонанса (ППР). Хотя иммуносенсоры очень селективны, скорость анализа зависит от времени инкубации, необходимого для образования комплекса антиген/антитело. Кроме того, полная регенерация датчика также может занять довольно много времени [12, 13].

Иммуносенсоры используют для оценки качества иммунобиологических лекарственных препаратов, т.е. для качественного и количественного определения веществ в анализируемой пробе после реакции связывания антигена со специфичными антителами. Детекция может быть как прямой (когда исследуемое вещество само обладает ферментативной активностью либо помечено ферментативной меткой), так и косвенной (когда исследуемое вещество, связавшееся с иммобилизованными на твердой фазе антителами, инкубируется с антителами, меченными ферментативной меткой).

Среди иммуносенсоров выделяют четыре основных типа датчиков: измерители электрохимических процессов (потенциометрия, амперометрия); измерители массы (пьезоэффект); измерители

ли тепла (калориметрия); измерители оптических свойств. Количественный результат может быть получен в режиме реального времени.

Например, в работе [14] представлен одноразовый амперометрический магнитоиммуносенсор, включающий использование антител, иммобилизованных на поверхности магнитных шариков с белком G (ProtG-MB), и угольных электродов с трафаретной печатью, для количественного и специфического определения остатков тетрациклинов в молоке.

Для решения проблемы определения остатков антибиотиков в молоке авторы другого исследования [15] предложили объединить иммунофлуоресцентный анализ на основе многоцветных квантовых точек (QD) и метод матричного анализа для одновременного, чувствительного и визуального обнаружения стрептомицина, тетрациклина и пенициллина G в молоке. Антитела, специфичные к данным антибиотикам, конъюгировали с QD на разных длинах волн излучения (QD520 нм, QD565 нм и QD610 нм) и использовались в качестве зондов обнаружения. Детекцию проводили методом прямого конкурентного флуоресцентного иммуноанализа в лунках микротитровального планшета, покрытого антигеном, для одновременного качественного и количественного определения остатков указанных антибиотиков. Метод может обеспечить одновременный анализ нескольких антибиотиков в нескольких образцах за один прогон (высокопроизводительный анализ).

АПТАСЕНСОРЫ

Применение для аффинного взаимодействия аптамеров — молекул некоторых пептидов, коротких полимеров нуклеиновых кислот ДНК или РНК, а также их фрагментов (линейных олигонуклеотидов) — явилось началом разработки аптасенсоров. По специфичности взаимодействий аптамеры подобны антителам, но отличаются большей устойчивостью и способностью к обратимой денатурации, осуществляемой в течение нескольких минут. Развитие аптасенсоров может стать реальной альтернативой высокочувствительным и селективным иммуносенсорам для проведения экологического мониторинга лекарственных препаратов.

Применение иммобилизованных аптамеров в качестве элементов распознавания (аптасенсоры) является весьма перспективным при анализе антибиотиков, поскольку их чувствительность сопоставима с чувствительностью антител. Кроме того, они могут быть химически синтезированы, обладают высокой термической стабильностью, легко модифицируются и иммобилизуются [16].

Возможности применения электрохимического аптасенсора для высокочувствительного обнаружения

хлорамфеникола в меде показаны в работе [17]. Полимеразная реакция смещения цепи позволила определить наличие ократоксина в образцах виноградного сока [18]. Возможности применения аптамеров и теоретическое исследование с целью их дизайна и моделирования приведены в работе [19].

Методы комбинирования аптасенсора и флуоресценции являются наиболее распространенными благодаря их превосходной чувствительности и селективности, удовлетворительному пространственному и временному разрешению и экономической эффективности. Например, в работе [20] описан флуоресцентный аптасенсор для обнаружения хлорамфеникола с использованием конъюгированных с аптамером магнитных наночастиц как для индикации, так и для анализа концентрации препарата. Система биоанализа была изготовлена путем иммобилизации аптамера на поверхности магнитных наночастиц, которые использовались для захвата и концентрации хлорамфеникола и приводили к изменению флуоресцентного сигнала на поверхности магнитных наночастиц.

СЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ИМПРИНТИРОВАННЫХ ПОЛИМЕРОВ

Элементы распознавания, такие как антитела, антигены, иммуноглобулины, ферменты и аптамеры, наиболее часто применяемые при формировании рецепторного слоя сенсоров, характеризуются высокой специфичностью и позволяют получать информацию о протекании биохимической реакции в растворах практически в режиме реального времени. При использовании биологических объектов в качестве рецепторов актуальной является проблема повышения времени функционирования сенсоров на их основе. Сложность получения природных рецепторов, их неустойчивость при хранении, воздействии органических растворителей и высоких концентраций электролитов стимулирует поиски синтетических антител, в качестве которых могут выступать полимеры с молекулярными отпечатками, имеющие ряд несомненных достоинств по сравнению с биомолекулами.

Внимание исследователей к полимерам с молекулярными отпечатками связано с их уникальными свойствами обеспечивать высокую селективность молекулярного распознавания одного вида целевых молекул в присутствии множества других соединений близкого строения. К их несомненным достоинствам относятся методическая простота получения в отличие, например, от выработки антител к низкомолекулярным соединениям, являющейся многостадийным и длительным процессом, и высокая воспроизводимость синтезов. Кроме того, такие полимеры стабильны в агре-

сивных средах при резком изменении условий эксплуатации и могут быть синтезированы к фактически любому веществу — неорганическим ионам, наркотикам, нуклеиновым кислотам, белкам, клеткам и даже супертоксичным соединениям, для которых, например, поликлональные антитела получены быть не могут.

Одним из важных достижений в области биосенсорного анализа остатков антибактериальных препаратов в пищевых продуктах является применение полимерных сенсоров с молекулярной печатью (англ. *molecularly imprinted polymer sensors*) [21, 22]. Молекулярный импринтинг — это метод создания синтетических материалов, содержащих специфические рецепторные сайты, обладающие высоким сродством к молекуле-мишени. На сегодняшний день наработан значительный материал по теории функционирования молекулярно импринтированных полимеров и методики их синтеза для широкого круга аналитов, в том числе для лекарственных препаратов. Для получения пленок молекулярно импринтированных полимеров на поверхности электрода сенсора наибольшее распространение получили способ фотополимеризации покрытия при вращении (*spin-coating*), сэндвич-метод (*sandwich-casting*), а также способы термоиндуцированного разделения фаз, послойного депонирования (*layer-de-layer deposition*), электрополимеризации и смешанные подходы, основанные на нанотехнологиях [23, 24].

Формирование распознающего слоя на поверхности полимерного или золь-гель-материала способом поверхностного импринтинга позволяет осуществлять специфическое распознавание макромолекул или биоаналитов. Поверхность полимера геометрически и химически подгоняется под структуру аналита, что способствует обратимому и быстрому связыванию и удалению с поверхности «отпечатка» целевой молекулы.

В работе [5] представлен краткий обзор по изготовлению и свойствам электродов на основе трафаретной печати, описаны возможности их применения для обнаружения антибиотиков, бактерий и оценена их чувствительность к антибиотикам. На основе магнитных многостенных углеродных нанотрубок разработан магнитно-импринтированный электрохимический сенсор для чувствительного определения канамицина в реальных образцах [25].

АКУСТИЧЕСКИЕ БИОСЕНСОРЫ

Принцип действия электроакустических методов анализа основан на регистрации биоспецифических реакций в жидкой суспензии, контактирующей с поверхностью пьезоэлектрического

звукопровода, по которому распространяется пьезоактивная акустическая волна.

В последнее время для создания акустических сенсоров широко используются пьезоэлектрические резонаторы или линии задержки с распространяющейся поверхностной или пластинчатой акустической волной. Такие биосенсоры чувствительны к изменению механических или электрических свойств биологического объекта, контактирующего с поверхностью звукопровода. Акустические волны, возбуждаемые в пьезоэлектрической среде, позволяют создать целое семейство датчиков, характеризующихся высокой чувствительностью, быстротой проведения анализа, дешевизной и небольшими размерами [26].

Наиболее часто акустические биологические датчики содержат активный слой с иммобилизованными антителами, которые анализируются на устойчивость к различным антибиотикам. В этом случае причиной изменения выходного аналитического сигнала акустического иммуносенсора является увеличение массы распознающего слоя при взаимодействии с определяемым соединением (прямой формат иммуноанализа) или с антителами к нему (конкурентный формат иммуноанализа). Например, на этом принципе разработан иммуносенсор, включающий пьезоэлектрический резонатор и слой электрогенерированного полимера для определения следовых количеств хлорамфеникола в мясе, молоке, яйцах, меде [27]. Этим же коллективом авторов проведен подбор условий синтеза наночастиц полимеров с молекулярно-импринтированными полимерами для применения в качестве распознающего слоя пьезоэлектрического сенсора для высокочувствительного определения рактопамина в водных средах [28]. В работе [29] описана возможность применения пьезоэлектрического сенсора на базе магнитных наночастиц для выявления и определения тетрациклина в жидких средах.

Известны также биосенсоры на основе поверхностных акустических волн, которые использовались для быстрого обнаружения пенициллина G в молоке [30]. Это первый случай использования подобного биосенсора для обнаружения антибиотиков.

Весьма перспективным для анализа антибиотиков является акустический биологический датчик на основе двух пьезоэлектрических пластин, разделенных воздушным зазором. В работе [31] показано, что изменение выходного сигнала датчика при добавлении ампициллина к суспензии микробных клеток зависит от концентрации препарата, что открывает возможность не только качественного, но и количественного анализа.

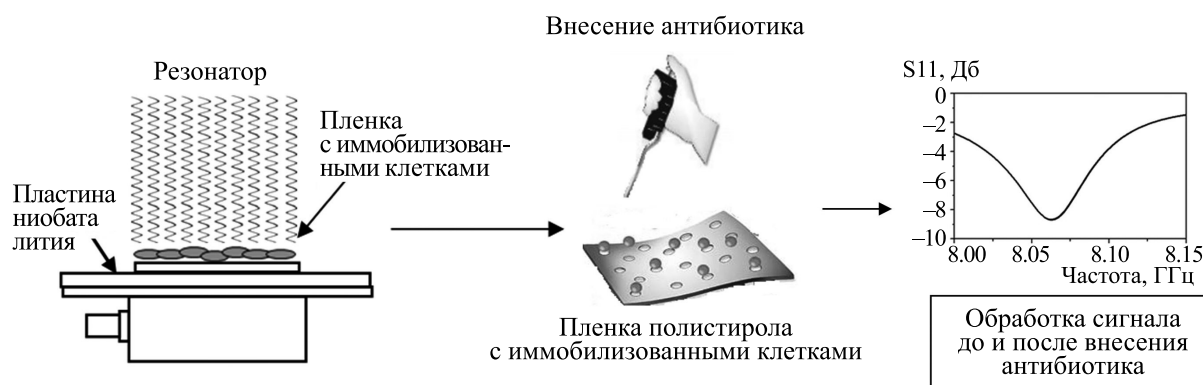


Рис. 3. Общая схема работы датчика на основе сверхвысокочастотного резонатора.

МИКРОБНЫЕ СЕНСОРНЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ

В последнее время наблюдается повышенный интерес к разработке биосенсоров, биорецептором которых являются живые ткани, бактерии и микроорганизмы. Данный тип биосенсоров имеет множество преимуществ перед ферментными биосенсорами. Прежде всего это связано с тем, что в клетках существует множество ферментов, коферментов и кофакторов, что открывает широкие возможности для определения огромного количества химических веществ. Другим несомненным преимуществом такого вида сенсоров является то, что клетки легче адаптировать к потреблению и разложению нового субстрата. Кроме того, прогресс в молекулярной биологии открыл неограниченные возможности для производства микроорганизмов с заданными свойствами, улучшающими деятельность либо уже существующего в них фермента, либо экспрессии чужеродного фермента в клетку-хозяина.

Микроорганизмы, проявляющие чувствительность к определяемому антибиотику, в комплексе с электрофизическим датчиком, могут представлять простые, чувствительные и быстродействующие сенсоры. Описано несколько биосенсоров для обнаружения остатков антибиотиков, основанных на применении ферментативной активности микроорганизмов [32, 33]. Например, системы мониторинга бета-лактамов антибиотиков основаны на тех же принципах, что и тесты микробиологического ингибирования [34], с той разницей, что сигнал реакции биораспознавания определяется или количественно, или полуколичественно. Микробные биосенсоры основаны на измерении ингибирования роста бактерий из-за присутствия антибиотиков и представлены в работах [35, 36].

Особый интерес представляют микробные датчики, позволяющие проводить исследование без иммобилизации компонентов анализа. На-

пример, в работе [37] описан микроволновый микрожидкий биосенсор для быстрого и бесконтактного тестирования концентрации и роста *Escherichia coli* в среде с различным pH, а также в присутствии антибиотиков.

Авторы работы [38] представили бактериальный штамм *E. coli*, содержащий оперон люциферазы, с помощью которого можно определять тетрациклин биолуминесцентным датчиком. Эти бактерии могут храниться в лиофилизированной форме и производят самобиолуминесценцию при распознавании тетрациклина.

Наномеханические биосенсоры относятся к подсемейству микроэлектромеханических систем, состоящему из подвижных подвешенных микроструктур, способных преобразовывать биологические процессы в измеримое механическое движение. Благодаря своей высокой чувствительности, быстрому отклику и высокой пропускной способности наномеханическая технология обладает большим потенциалом для преодоления некоторых ограничений традиционных методов. Например, в работе [39] представлены возможности наномеханических сенсоров не только для обнаружения бактерий, но и анализа воздействия на них антибиотиков.

Описаны микробные сенсоры, где бактерии используются в качестве чувствительного элемента и иммобилизованы на поверхности датчика. Так, в работе [40] продемонстрирована возможность определения ампициллина с помощью микробной сенсорной системы и датчика на основе свхвысокочастотного резонатора. Общая схема такого датчика представлена на рис. 3. Показано, что воздействие ампициллина приводит к существенному изменению минимального значения коэффициента отражения S_{11} вблизи резонансной частоты и зависит от концентрации антибиотика.

В работе [41] представлен интегрированный биосенсор на базе смартфона LumiCellSense, ко-

торый включает в себя 16-луночный биочип с кислородопроницаемым покрытием с иммобилизованными биолюминесцентными клетками *E. coli* для определения ципрофлоксацина в цельном молоке.

ОПТИЧЕСКИЕ БИОСЕНСОРЫ

В оптических биосенсорах аналитический сигнал обусловлен не химическим взаимодействием определяемого компонента с чувствительным элементом, а измеряемыми физическими параметрами — интенсивностью поглощения и отражения света, интенсивностью люминесценции объекта и т.д. Принцип действия оптических биосенсоров основан на регистрации изменений оптических свойств среды: оптической плотности (денситометрические биосенсоры), цвета (колориметрические биосенсоры), мутности (турбидиметрические биосенсоры), показателя преломления среды (рефрактометрические биосенсоры) в результате присутствия биологического агента. В настоящее время наибольшее развитие получили оптические биосенсоры, основанные на изменении направления распространения светового потока, проходящего через оптическое волокно или треугольную призму, покрытую тонкой пленкой металла. Они основаны на эффекте поверхностного плазмонного резонанса. Оптические биосенсоры, включая планарные волноводные сенсоры, были разработаны одновременно с первыми электрохимическими устройствами, но в течение длительного времени они не получили должного внимания [9].

В конце 60-х годов XX века Е. Кретчманном была показана возможность возбуждения поверхностных плазмонов поляризованным светом, что послужило толчком к развитию метода поверхностного плазмонного резонанса. ППР представляет собой явление, возникающее на границе раздела фаз, например, стеклянная призма — металлическая пленка. Часть луча света, проходящего через призму и падающего под определенным углом на поверхность металла, распространяется в металлической пленке в виде затухающей электромагнитной волны, которая вызывает коллективные колебательные движения свободных электронов. Эти колебательные движения электронов (поверхностные плазмоны) в металлической пленке сопровождаются электрическим полем, которое экспоненциально убывает с увеличением расстояния от поверхности диэлектрика (призмы). Связь изучаемого объекта с поверхностью металлической пленки приводит к изменению скорости распространения плазмонов и, следовательно, к изменению угла пространственного резонанса. Изменение угла пространственного резонанса можно отслеживать в режиме реального времени, получая ин-

формацию о кинетике взаимодействий, возникающих на поверхности металлической пленки [42, 43].

В дальнейшем, используя явление плазмонного резонанса, рядом исследователей была показана возможность его применения для анализа антибиотиков. Согласно данным, представленным в работе [4], оптические биосенсоры на основе ППР довольно часто используются для обнаружения или количественного определения остатков антибактериальных или противомикробных препаратов в пищевой промышленности. Использование ППР примерно в два с половиной раза больше, чем у любого другого метода оптического биодатчика, из-за его надежности и высокой экономической эффективности. Возможности применения ППР биосенсоров для определения антибиотиков показаны в работе [44].

Другой важной, но менее изученной областью применения является использование гибридных методов, которые сочетают электрохимию с оптическими методами для определения ампициллина в речной воде [45]. Авторы другого исследования представили экспериментальную гибридную платформу, объединяющую пластиковое оптическое волокно с поверхностным плазмонным резонансом и электрохимический (био)сенсор для анализа ампициллина в воде [46].

Интересный подход к распознаванию аминокликозидов (неомицина, канамицина, стрептомицина) в образцах молока с использованием функционализированных наночастиц золота для усиления сигнала ППР и повышения чувствительности сенсора описан в работе [47].

Одним из новейших методов оценки изменения электрофизических и морфометрических параметров микробных клеток без их иммобилизации под влиянием электрического поля в режиме реального времени без специальной пробоподготовки является электрооптический мониторинг [48]. Общая схема электрооптического датчика представлена на рис. 4. Воздействие антибактериальных препаратов на микробные клетки может быть зафиксировано в жидкой фазе с помощью оптической сенсорной системы, что и показано в работе [49] при определении ампициллина.

Фотонный подход для анализа антибиотиков и мониторинга устойчивости бактерий к ним продемонстрирован в работе [50]. Добавление в среду измерения антибиотиков приводит к изменению оптических свойств и подвижности бактерий, что контролируется с помощью измерения резонансной длины волны. Анализ позволяет параллельно изучать как оптический, так и электрический ответ отдельных бактерий и контролировать скорость их метаболизма после воздействия антибиотиков.

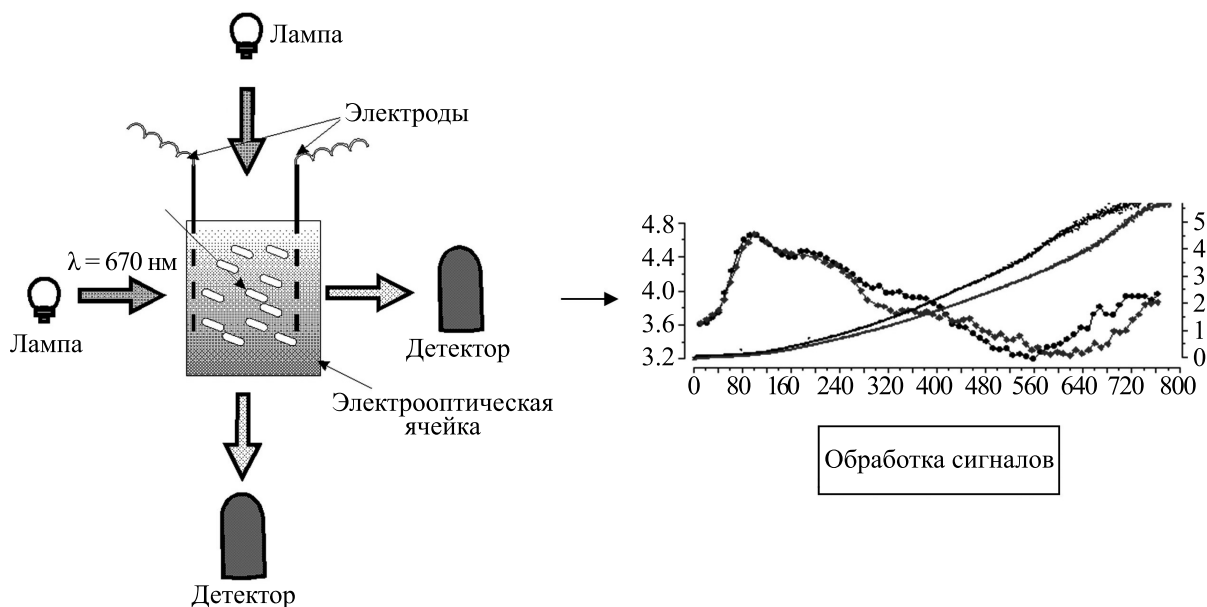


Рис. 4. Общая схема электрооптического датчика.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С момента открытия пенициллина в 1929 г. человечество активно использует этот и другие антибиотики для борьбы с бактериальными заболеваниями. Доступность антибиотиков, низкая стоимость их производства, неправильное и чрезмерное использование приводит к широкому распространению антибиотиков в окружающей среде, в частности, к высокому загрязнению водных ресурсов. Поэтому существует большая потребность в мониторинге и определении антимикробных препаратов в различных средах; продуктах питания, напитках и образцах промышленной и питьевой воды и т. д. Для определения антибиотиков разработано достаточно большое количество методов. Фармакокинетические исследования, проводимые на биологических средах, требуют определения низких концентраций антибиотиков ($C_{\min} < 10$ мкг/мл), следовательно, для данных целей необходимы более чувствительные и быстрые методы. На практике также часто возникает проблема детекции антибиотиков на большом массиве образцов. Перспективными методами анализа противомикробных препаратов являются биосенсорные технологии. Биосенсорные методы имеют довольно широкое применение и постепенно становятся неотъемлемой частью при клинической диагностике и экологическом мониторинге. Биосенсоры позволяют значительно уменьшить время проведения анализа благодаря относительной простоте проведения процедур, обходятся минимальной предварительной обработкой исследуемого материала и, как показывают литературные данные, являются довольно чувствительными.

Биосенсорные системы для определения антибиотиков можно условно разделить на две большие группы – сенсоры без иммобилизации и с иммобилизацией компонентов анализа.

В таблице представлены краткие данные о биосенсорных системах для анализа антибиотиков.

С нашей точки зрения наиболее перспективными для анализа антибиотиков являются сенсоры, позволяющие проводить анализ непосредственно в жидкости без предварительной подготовки образца. Немаловажным фактором является возможность многократного использования сенсоров, но в этом случае сразу возникает вопрос о методах очистки датчика от отработанного образца. К сожалению, не во всех работах, описывающих многократное применение датчиков, приводятся данные о способах их очистки. В зависимости от условий, в которых проводится анализ препаратов, иногда проще применять одноразовые системы, но в таком случае возникает другой вопрос, связанный с условиями утилизации отработанных систем. Основываясь только на литературных данных, нельзя сделать объективный вывод о перспективности тех или иных датчиков, относящихся к разным типам.

Тем не менее постоянно возникает необходимость для развития надежных и чувствительных биосенсоров, позволяющих проводить анализ широкого спектра антибиотиков. В идеале хорошо иметь сеть биосенсоров «скоростного типа», которые будут использоваться в качестве первоначального заключения о наличии/отсутствии антибактериального препарата в диагностируе-

Краткие сведения о биосенсорах, разработанных для анализа антибактериальных препаратов

№ п/п	Принцип действия, чувствительный элемент	Определяемый антибиотик	Пределы детекции	Источник
1	Электрохимическое определение проводится с использованием прямоугольной адсорбционной анодной вольтамперометрии с помощью стеклоуглеродного электрода и пленки хитозана	Норфлоксацин	6.6 нмоль/мл	[10]
2	Датчик использует самосборный иммуноанализ для определения биомаркера цефтиофура с помощью спектроскопии электрохимического импеданса путем исследования межфазных емкостных изменений при связывании цефтиофура с поверхностью датчика	Цефтиофур	0.01 нг/мл при анализе в фосфатно-солевом растворе и 10 нг/мл при анализе в образцах фарша из мяса индейки	[11]
Иммуносенсоры				
3	Амперометрический магнитоиммуносенсор, включающий использование антител, иммобилизованных на поверхности магнитных шариков	Тетрациклин	44 нг/мл в образцах молока	[14]
4	Метод прямого конкурентного флуоресцентного иммуноанализа в лунках микротитровального планшета, покрытого антигеном, для одновременного определения антибиотиков	Стрептомицин, тетрациклин и пенициллин G в молоке	5 нг/мл для всех указанных антибиотиков	[15]
Аптасенсоры				
5	Электрохимический аптасенсор с применением аптамера, иммобилизованного на электроде	Хлорамфеникол в меде. Охратоксин в виноградном соке	0.29 нМ 5 нМ	[17] [18]
6	Флуоресцентный аптасенсор с применением аптамера, иммобилизованного на поверхности магнитных наночастиц	Хлорамфеникол	0.01 нг/мл	[20]
Сенсоры на основе молекулярно-импринтированных полимеров				
7	Магнитно-импринтированный электрохимический сенсор для определения антибиотиков	Канамицин в реальных образцах	$2.3 \cdot 10^{-11}$ моль/мл (отношение сигнал/шум 3 дБ)	[25].
Акустические биосенсоры				
8	Иммуносенсор, включающий пьезоэлектрический резонатор и слой электрогенерированного полимера Пьезоэлектрический сенсор с молекулярно-импринтированными полимерами в качестве распознающего слоя	Хлорамфеникол в мясе, молоке, яйцах, мед.	0.2 нг/мл	[27]
		Рактопамин в водных средах.	12 мкг/мл	[28]
		Тетрациклин в водных растворах	4.5 мкг/см ³	[29]
9	Сенсор на основе поверхностных акустических волн	Пенициллин G в молоке	2 нг/мл при анализе в буфере и 2.2 нг/мл при анализе в нежирном молоке	[30]
10	Акустический биологический датчик на основе двух пьезоэлектрических пластин, разделенных воздушным зазором	Ампициллин в водных средах	2 мкг/мл	[31]
Микробные сенсорные системы				
11	Биолюминисцентный датчик на основе штамма <i>E. coli</i> K-12, который содержит оперон бактериальной люциферазы <i>Photorhabdus luminescens</i>	Тетрациклины	5 нг/г для доксициклина; 7.5 нг/г для хлор-тетрациклина и 25 нг/г для тетрациклина и окситетрациклина в тканях рыбы	[38]
12	Сенсорная система на основе сверхвысокочастотного резонатора и микробных клеток	Ампициллин	4 мкг/мл	[40]
13	Сенсор на базе смартфона LumiCellSense, состоящий из 16-луночного биочипа с биолюминесцентными клетками	Ципрофлоксацин в цельном молоке	7.2 нг/мл	[41]
Оптические биосенсоры				
14	Датчик на основе ППП с использованием функционализированных наночастиц золота для усиления сигнала	Аминогликозиды (неомицин, канамицин, стрептомицин) в образцах молока	2.00 ± 0.21 pM, 1.00 ± 0.10 pM, 200 ± 30 fM	[47]
15	Электрооптический сенсор на основе микробных клеток, чувствительных к определяемому антибиотику	Ампициллин	0.5 мкг/мл	[49]

мом образце. Для достижения этой цели желательно использовать портативный биосенсор с высокой чувствительностью и точностью, который может обнаруживать антибиотик в режиме реального времени.

В целом, как представлено в данном материале, область биосенсоров включает широкий спектр с большим потенциалом роста в ближайшем будущем. Дальнейшая стандартизация и автоматизация биосенсорных методов позволит расширить круг их применения и использования в микробиологии, биотехнологии, ветеринарии, медицине и для защиты окружающей среды.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках Государственного задания и Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-07-00304).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. Ierapetritou, F. Muzzio, and G. Reklaitis. *AIChE J.* **62**, 1846 (2016).
2. *World Health Organization. Tackling Antibiotic Resistance from a Food Safety Perspective in Europe; World Health Organization Regional Office for Europe* (Copenhagen, Denmark, 2011), pp. 1–88.
3. *Methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents Terminology*, EUCAST Definitive Document **4**, 291 (1998).
4. N. A. Mungroo and S. Neethirajan, *Biosensors* **4**, 472 (2014).
5. F.-D. Munteanu, A. M. Titoiu, J.-L. Marty, and A. Vasilescu, *Sensors* **18**, 901 (2018).
6. B. Leca-Bouvier and L. Blum, in *Recognition receptors in biosensors*, Ed. by M. Zourob (Springer, New York, 2010), pp. 177–220.
7. F. Moreira, R. Dutra and J. Noronha, and M. G. F. Sales, *Biosens. Bioelectron.* **56**, 217 (2014).
8. Г. К. Будников, Г. А. Евтюгин и В. Н. Майстренко, *Модифицированные электроды для вольтамперометрии в химии, биологии и медицине* (Лаборатория знаний, Москва, 2020).
9. G. Evtugyn, *Biosensors. Essentials* (Springer, 2013).
10. A. M. Santos, A. Wong, F. H. Cincotto, et al., *Mikrochim. Acta* **186** (3), 148 (2019).
11. H. S. Stevenson, S. S. Shetty, N. J. Thomas, et al., *ACS Omega* **4**, 6324 (2019).
12. F. Fernandez, K. Hegnerova, M. Piliarik, et al., *Biosens. Bioelectron.* **26**, 1231 (2010).
13. F. Fernandez, D. G. Pinacho, F. Sanchez-Baeza, and M. P. Marco, *J. Agricult. Food Chem.* **59**, 5036 (2011).
14. F. Conzuelo, M. Gamella, S. Campuzano, et al., *Anal. Chim. Acta* **737**, 29 (2012).
15. E. Song, M. Yu, Y. Wang, et al., *Biosens. Bioelectron.* **72**, 320 (2015).
16. K. Reder-Christ and G. Bendas, *Sensors* **11**, 9450 (2011).
17. L. Yan, C. Luo, W. Mao, et al., *J. Electroanal. Chem.* **687**, 89 (2012).
18. S. M. Taghdisi, N. M. Danesh, M. Ramezani, et al., *Talanta* **223** (Pt. 1), 121705 (2021).
19. A. A. Buglak, A. V. Samokhvalov, A. V. Zherdev, and B. B. Dzantiev, *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 8420 (2020).
20. S. Wu, H. Zhang, Z. Shi, et al. *Food Control.* **50**, 597 (2015).
21. W. Lian, S. Liu, J. Yu, et al., *Biosens. Bioelectron.* **38**, 163 (2012).
22. M. L. Yola, L. Uzun, N. Özaltın, and A. Denizli, *Talanta* **120**, 318 (2014).
23. Т. Н. Ермолаева, В. Н. Чернышова, Е. В. Чеснокова и О. И. Бессонов, *Сорбционные и хроматографические процессы* **15** (2), 151 (2015).
24. G. Vasapollo, R. D. Sole, L. Mergola, et al., *Int. J. Mol. Sci.* **12** (9), 5908 (2011).
25. F. Long, Z. Zhang, Z. Yang, et al., *J. Electroanal. Chem.* **755**, 7 (2015).
26. G. N. Durmuş, R. L. Linb, M. Kozbergc, et al., *Acoustic-Based Biosensors. Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics* (Springer Science+Business Media, N. Y., 2014).
27. N. A. Karaseva and T. N. Ermolaeva, *Talanta* **93**, 44 (2012).
28. T. N. Ermolaeva, O. V. Farafonova, V. N. Chernyshova, et al., *J. Anal. Chem.* **75** (10), 1270 (2020).
29. Е. В. Бизина, О. В. Фарафонова, Н. В. Тарасова и Т. Н. Ермолаева, *Сорбционные и хроматографические процессы* **21** (2), 177 (2021).
30. F. J. Gruhl and K. Länge. *Food Anal. Methods* **7**, 430 (2014).
31. O. I. Guliy, B. D. Zaitsev and I. A. Borodina, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **104** (3), 1283 (2020).
32. A.M. Ferrini, V. Mannoni, G. Carpico et al. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 784 (2008).
33. S. Das, N. Kumar, R. H. Vishweswaraiiah, et al., *J. Food Sci. Technol.* **51**, 1161 (2014).

34. C. Cháfer-Pericás, Á. Maquieira, and R. Puchades, *Trends Anal. Chem.* **29**, 1038 (2010).
35. R. Babington, S. Matas, M. P. Marco, and R. Galve, *Anal. Bioanal. Chem.* **403**, 1549 (2012).
36. M. C. Beltran, M. I. Berruga, A. Molina, et al., *Int. Dairy J.* **41**, 13 (2015).
37. R. Narang, S. Mohammadi, A. M. Mohammadi, et al., *Sci. Rep.* **8**, 15807 (2018).
38. N. E. Virolainen, M. G. Pikkemaat, J. W. A. Elferink, et al., *J. Agric. Food Chem.* **56**, 11065 (2008).
39. F. Pujol-Vila, R. Villa, and M. Alvarez, *Front. Mech. Eng.* **6** (2020). DOI: 10.3389/fmech.2020.00044
40. O. I. Guliy, B. D. Zaitsev, A. V. Smirnov, et al., *Biosens. Bioelectron.* **130**, 95 (2019).
41. M.-Y. Lu, W.-C. Kao, S. Belkin, and J.-Y. Cheng, *Sensors* **19**, 3882 (2019).
42. N. J. De Mol and M. J. E. Fischer, *Surface Plasmon Resonance. Methods and Protocols* (Humana Press, New Jersey, 2010).
43. C. Garcia-Aljaro, X. Munoz-Berbel, A. T. A. Jenkins, et al., *Appl. Environ. Microbiol.* **74** (13), 4054 (2008).
44. H.-F. Chen, C.-H. Lin, C.-Y. Su, et al., in *Biosensors for Health, Environment and Biosecurity* (2011), Chapt. 21, pp. 453–468.
45. A. Blidar, B. Feier, M. Tertis, et al. *Anal. Bioanal. Chem.* **411**, 1053 (2019).
46. R. Galatus, B. Feier, C. Cristea, N. Cennamo, and L. Zeni, *Proc. SPIE* **10405**, id. 104050C (2017).
47. M. Frasconi, R. Tel-Vered, M. Riskin, and I. Willner. *Anal. Chem.* **82**, 2512 (2010).
48. O. I. Guliy and V. D. Bunin, in *Biointerface Engineering: Prospects in Medical Diagnostics and Drug Delivery*, Ed. by P. Chandra and L. M. Pandey (Springer, 2020), chapter 11, pp. 233–254.
49. O. I. Guliy, S. S. Evstigneeva, and V. D. Bunin, *Talanta* **225**, 122007 (2021).
50. D. Conteduca, G. Brunetti, F. Dell'Olio, et al., *Biomed. Optics Express* **10** (7), 463 (2019).

Biosensor Systems for Antibiotics Detection

O.I. Guliy*, **, B.D. Zaitsev*, A.K.M Alsowaidi****, O.A. Karavaeva*,
L.G. Lovtsova**, and I.A. Borodina*****

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

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

****Saratov Branch of Kotelnikov Institute of Radioengineering and Electronics, Russian Academy of Sciences,
ul. Zelenaya 38, Saratov, 410019 Russia*

Antibiotics are widely used in medicine, veterinary and the food industry. However, the active use of antibacterial drugs leads to environmental pollution. In this regard, there is a great need for monitoring and determining antibiotics in various environments such as drinking water, food, beverages, pharmaceutical waste water from pharmaceutical enterprises, etc. A sufficient number of methods have been developed to determine antibiotics, including those which based on biosensors. Biosensor methods of analysis are widely used and are an integral part of environmental monitoring. Electrochemical, optical, acoustic, microbial biosensors, immuno- and aptasensors, as well as sensors based on molecular imprinted polymers are the most popular for the analysis of antibiotics. The article provides a brief overview of biosensor methods and approaches for the antibiotics determination. The analysis of the most promising biosensor systems for antibacterial drugs detection has been carried out.

Keywords: antibiotics, detection methods, biosensors, aptamers, antibodies, microbial cells