

УДК 577.3, 579.61

## НАНОВИБРАЦИИ КАНТИЛЕВЕРА АТОМНО-СИЛОВОГО МИКРОСКОПА КАК СИСТЕМА ДЕТЕКЦИИ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ БАКТЕРИЙ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

© 2021 г. С.Н. Плескова\*, \*\*, О.И. Фомичев\*, Р.Н. Крюков\*, И.С. Судакова\*\*

\*Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, 603950, Нижний Новгород, просп. Гагарина, 23/3

\*\*Нижегородский государственный технический университет им. Р.Е. Алексеева, 603950, Нижний Новгород, ул. Минина, 24/1

E-mail: pleskova@mail.ru

Поступила в редакцию 20.05.2021 г.

После доработки 02.07.2021 г.

Принята к публикации 16.09.2021 г.

Атомно-силовая микроскопия была использована для детекции нановибраций кантилевера, возникающих в результате метаболической активности *Escherichia coli*. Показано, что использование поли-L-лизина эффективно для закрепления бактерий на кантилевере с сохранением их метаболической активности. Варианта амплитуды колебаний кантилевера статистически значимо отличается между контролем (кантилевер, функционализированный поли-L-лизином) и опытом (кантилевер с фиксированными на нем бактериями). Продемонстрировано, что использование атомно-силовой микроскопии дает возможность определять антибиотикорезистентность штамма в течение часа, в отличие от методов, используемых в клинической практике и предоставляющих ответ об антибиотикорезистентности за несколько суток.

*Ключевые слова:* атомно-силовая микроскопия, антибиотикорезистентность, нановибрации, кантилевер, бактерии, антибиотики.

DOI: 10.31857/S0006302921060065

Антибиотикорезистентность является одним из глобальных медицинских кризисов, поскольку антибиотики теряют свою эффективность в отношении стремительно растущего числа бактериальных патогенов [1]. Вместе с тем инфекционные заболевания по данным Всемирной организации здравоохранения ежегодно являются этиологической причиной заболеваний у 2 млрд человек и для 17 млн. они заканчиваются летальным исходом [2]. Не менее проблемными являются нозокомиальные инфекции в стационарах как хирургического, так и терапевтического профиля. В частности, в работе [3] показано, что антибиотикорезистентные *Escherichia coli* в условиях многопрофильного стационара в отделении травматологии и ортопедии выявляются в 74% случаев. Проблема формирования множественной лекарственной устойчивости является обще-медицинской и общебиологической, поскольку резистентность сформирована у многих штаммов

вирусов (например, большинство штаммов гриппа резистентны к амантадину [4], некоторые штаммы вирусов герпеса устойчивы к ацикловиру [5]), грибов (например, резистентность *Candida albicans* к азольным препаратам [6]), простейшим (например, *Plasmodium vivax* резистентна к хлорохину [7]). Одной из причин формирования антибиотикорезистентности является достаточно длительное проведение анализа «на флору и чувствительность к антибиотикам». За время ответа на вопрос о чувствительности/резистентности выделенной микрофлоры к антибиотикам пациентам назначается этиотропная терапия – в основном антибиотики широкого спектра действия, что способствует выработке резистентности и внутрибольничной персистенции нозокомиальных штаммов. Диско-диффузионный метод, традиционно используемый в клинической лабораторной диагностике, дает ответ на вопрос об антибиотиках, к которым чувствителен выделенный штамм, только спустя пять-семь суток после забора материала. В 2017 г. группа проф. С. Казаса [8] предложила принципиально новую методику быстрого определения чувстви-

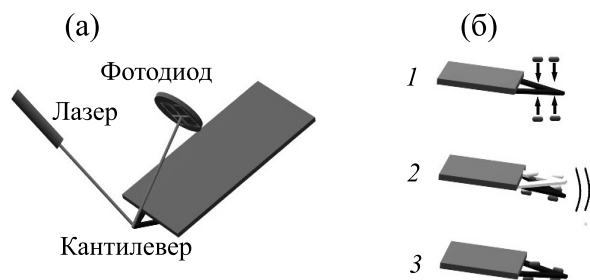
*Сокращения:* АЧХ – амплитудно-частотная характеристика, DFL – разностный сигнал между верхним и нижним участками фотодиода (difference signal between top and bottom halves of the photodiode)..

тельности бактерий к антибиотикам. Она основана на использовании принципов работы атомно-силового микроскопа, когда наномеханический сенсор (кантилевер) колеблется в том случае, если прикрепленные на нем бактерии метаболически активны [9, 10]. Эта система имеет следующие преимущества по сравнению с традиционно используемыми: 1) она не зависима от бактериального роста, поэтому результат выдается через один-полтора часа по сравнению с сутками, необходимыми при использовании диско-диффузионного метода; 2) чтобы достичь распознаваемого сигнала, необходимо  $10^2$  бактерий [11]. Таким образом, предложенная система имеет высокую чувствительность и скорость, что позволяет рассматривать ее как чрезвычайно перспективную для определения резистентности бактерий к антибиотикам. Нужно отметить, что атомно-силовая микроскопия прекрасно зарекомендовала себя не только как метод высокоразрешающей микроскопии. Она используется для динамического мониторинга за состоянием клеток и отдельных молекул, определения наномеханических свойств биологических объектов, внутриклеточного фишинга отдельных молекул, исследования межклеточных адгезионных контактов [12].

В связи с вышесказанным целью данного исследования была разработана собственная методика определения резистентности бактерий к антибиотикам. Для достижения цели ставились следующие задачи: 1) отработка метода фиксации бактерий на кантилевере, который, с одной стороны, не давал бы возможности бактериям десорбироваться с поверхности кантилевера, а с другой — не ограничивал метаболическую активность бактерий, что могло бы отразиться на нановибрациях кантилевера; 2) отработать систему детекции сигнала, для чего выбрать оптимальные по физико-химическим параметрам кантилеверы и режим работы атомно-силового микроскопа; 3) протестировать на одном бактериальном штамме два разных антибиотика, к одному из которых он чувствителен, а к другому — резистентен; 4) выбрать надежные физические параметры, корректно описывающие наблюдаемый эффект антибиотикорезистентности.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Чувствительный к гентамицину и резистентный к цефтриаксону штамм *E. coli* 321 взяли из музейной культуры Научно-образовательного центра «Физика твердотельных наноструктур» ННГУ им. Н.И. Лобачевского. Штамм выращивали на LB-бульоне (Invitrogen, 37°C, 18 ч), после чего трижды отмывали LB-бульоном (450 г, 5 мин) и взвешивали в концентрации  $10^9$  кл/мл



**Рис. 1.** (а) — Схема установки детектора нановибраций: луч лазера фокусируется на кончике кантилевера и отражается от него в центр четырехсекционного фотодиода, смещения отражения на фотодиоде используются для детектирования нановибраций как сигнала DFL. (б) — Схема эксперимента: 1 — когда бактерии не прикреплены к датчику, нановибрации возникают под действием только теплового движения и малы; 2 — после прикрепления живых бактерий нановибрации связаны с их метаболической активностью и высоки; 3 — после воздействия антибиотика бактерии нежизнеспособны и колебания возвращаются к низким уровням.

на спектрофотометре СПЕКС-ССП («Спектроскопические системы», Россия) при длине волны  $\lambda = 670$  нм, что соответствовало 10 ME.

Общая схема эксперимента представлена на рис. 1.

Апробировали три вида  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -кантилеверов: D-DNP ( $f_0 - 12-24$  кГц,  $k - 0.06$  Н/м), C-MLCT ( $f_0 - 4-10$  кГц,  $k - 0.010$  Н/м) и A-MLCT ( $f_0 - 22$  кГц,  $k - 0.07$  Н/м) (Bruker, США) и фиксацию 0.01%-м поли-L-лизином (Merck, США). Для фиксации бактерий кантилеверы предварительно обрабатывали поли-L-лизином (24°C, 10 мин), после чего трехкратно аккуратно отмывали дистиллированной водой. Кантилеверы оставляли сушиться (24°C, 5 мин), после чего наносили на них суспензию бактерий и инкубировали (37°C, 30 мин).

По окончании инкубации кантилевер устанавливали в холдер атомно-силового микроскопа NTegra («NT-MDT», Россия) и погружали в аналитическую камеру с 5 мл LB-бульона. Для контроля использовали кантилевер, покрытый поли-L-лизином, но без бактерий.

Устанавливали лазер в центр четырехсекционного фотодиода, переводили микроскоп в режим регистрации осцилляций (Nova, версия Pх.3.4.0 rev 17188, режим «Oscilloscope») и снимали аналитический сигнал DFL (difference signal between top and bottom halves of the photodiode — разностный сигнал между верхним и нижним участками фотодиода). Нановибрации в контроле и в опыте с бактериями снимали в течение 60 мин.

Затем из аналитической камеры отбирали 2 мл LB-бульона и вносили в нее 4%-й раствор гентамицина сульфата («Микроген», Россия) в количестве 2 мл (конечная концентрация гентамицина сульфата 16 мг/мл), либо 1%-й раствор цефтриаксона (ПАО «Бiosинтез», Россия) в количестве 2 мл (конечная концентрация 36 мг/мл). Опускали кантилевер с бактериями в раствор гентамицина либо цефтриаксона, инкубировали (24°C, 60 мин), после чего переводили микроскоп в режим регистрации сигнала DFL. Полученный массив данных обрабатывали в программе Origin Pro 8 SR4 v8.0951. С помощью Фурье-фильтра из аналитического сигнала удаляли колебания с частотами выше 1 Гц (колебания электросети и другие внешние колебания). Проводили определение квадрата стандартного отклонения (вариансы) в каждом из опытов для характеристики амплитуды сигнала кантилевера.

При анализе данных для учета вариаций характеристик кантилевера (поскольку, несмотря на принадлежность к одной партии, для них зафиксированы незначительные различия в резонансной частоте колебаний и отражающей способности покрытий, что сказывалось на учете и записи нановибраций) и различий в количестве фиксированных бактерий проводили нормировку данных, принимая за единицу сигнал DFL от кантилевера с бактериями с последующим принятием за ноль сигнала DFL от пустого кантилевера, функционализированного поли-L-лизинном.

Статистическую обработку проводили в программе Origin 8.0 (OriginLab Corp., США). Определяли границы нормального распределения количественных показателей выборок с использованием критерия Шапиро–Уилка. Поскольку распределения не соответствовали критериям нормальности, определяли медиану и 25-й процентиль. Для сравнения двух выборок использовали непараметрический критерий Вилкоксона.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Для решения первой задачи была апробирована фиксация 0.01%-м поли-L-лизинном. В случае использования поли-L-лизина различия в нановибрациях кантилевера в контроле и в опыте были существенными, что говорило о надежной фиксации бактерий на кантилевере при сохранении их метаболической активности, поэтому дальнейшие измерения проводили с поли-L-лизинном.

Были апробированы три вида кантилеверов. Изначально были выбраны нитрид кремниевые кантилеверы, поскольку их жесткость ниже, чем у кремниевых. Из трех апробированных вариантов кантилеверов наилучшим образом подходили

кантилеверы А-MLCT, поскольку, по всей вероятности, их физико-химические характеристики, прежде всего жесткость и резонансная частота, наилучшим образом соответствуют задачам регистрации нановибраций.

Фурье-преобразование полного спектра записанных результатов не дало существенных преимуществ при последующей обработке результатов. Однако весьма показательным было использование варианты (квадрата стандартного отклонения), характеризующей изменения амплитудно-частотных характеристик колебаний (АЧХ) кантилевера во всем спектре записи нановибраций.

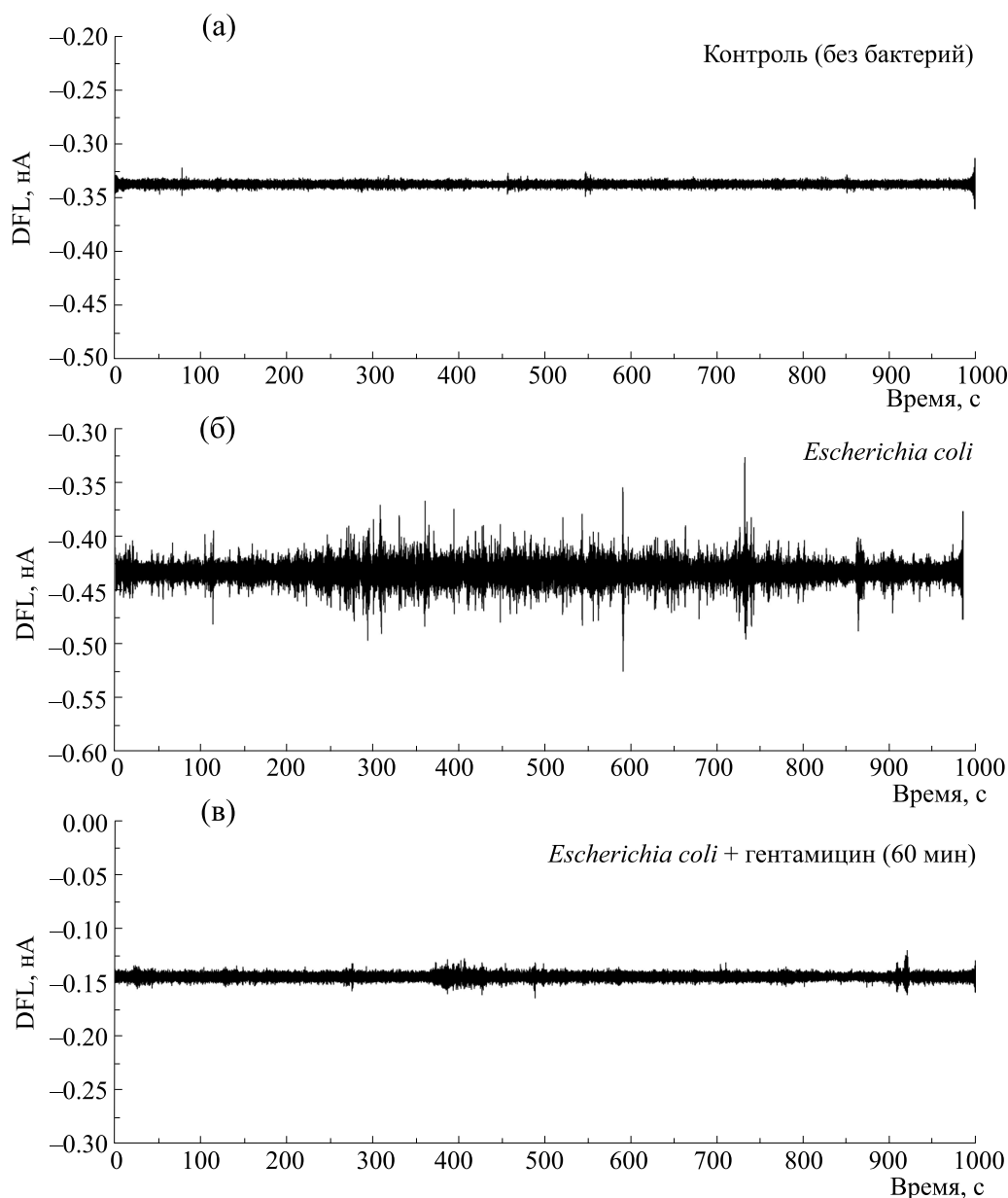
На рис. 2б очевидно изменение АЧХ кантилевера в случае фиксации на кантилевере А-MLCT поли-L-лизинном бактерий *E. coli* по сравнению с чистым кантилевером, функционализированным поли-L-лизинном (рис. 2а).

Часовая экспозиция в растворе гентамицина сульфата (16 мг/мл) кантилевера с фиксированными на нем бактериями вновь вызывает существенное изменение АЧХ (рис. 2в). В этом случае АЧХ больше соответствовала нановибрациям пустого кантилевера, функционализированного 0.01%-м поли-L-лизинном. При этом часовая экспозиция кантилевера с тем же штаммом *E. coli*, но в растворе цефтриаксона (36 мг/мл), к которому предварительно у данного штамма была выявлена резистентность, показала, что АЧХ кантилевера в контроле (кантилевер, с фиксированным на нем бактериями) и в опыте (кантилевер с бактериями, проинкубированный в растворе цефтриаксона) была одинакова (рис. 3). Таким образом, в случае использования антибиотика, к которому бактерии резистентны, в качестве отрицательного контроля, показано, что бактерии в течение часа не утрачивают своей метаболической активности.

Была проведена серия экспериментов по изучению изменений АЧХ кантилевера под влиянием фиксированных на нем бактерий и воздействия гентамицина сульфата. Результаты статистической обработки DFL в серии из девяти экспериментов представлены на рис. 4.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Механизм действия поли-L-лизина как фиксирующего агента следующий: имеющий положительный заряд поли-L-лизин опосредует взаимодействие отрицательно заряженного верхнего слоя клеточной стенки бактерий – липополисахарида с кантилевером через электростатические «слабые» взаимодействия [13]. Судя по кривым нановибрации, такое взаимодействие не оказывает существенного влияния на метаболизм бактерий. Существенное усиление нановибраций

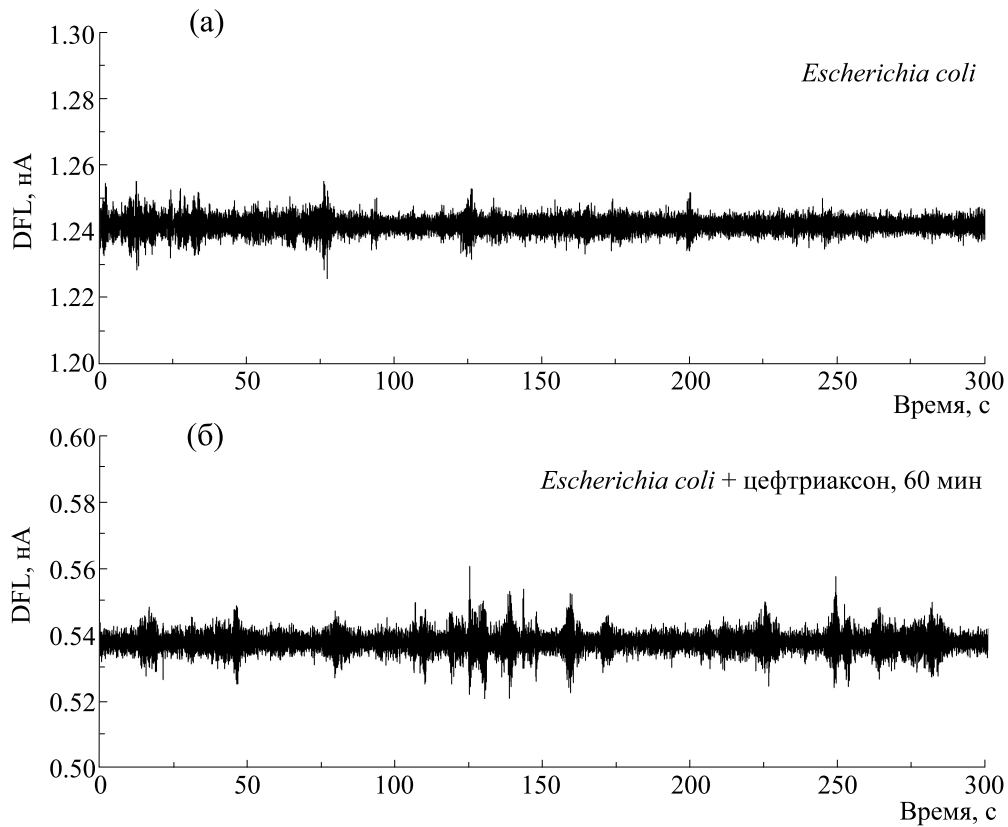


**Рис. 2.** Кривые нановибраций кантилевера: (а) – кантилевер без бактерий, функционализированный поли-L-лизинном, (б) – кантилевер с фиксированными на нем поли-L-лизинном *E. coli*, (в) – кантилевер с фиксированными на нем поли-L-лизинном *E. coli* после обработки гентамицином (16 мг/мл).

кантилевера в случае использования поли-L-лизина говорило о том, что бактерии успешно адгезируются на поверхности кантилевера, а их метаболическая активность при этом не нарушается.

Исследование разных кантилеверов для решения задачи регистрации нановибраций показало, что наилучшие показатели с наименьшим уровнем шума дает использование кантилеверов А-MLCT со следующими характеристиками:  $f_0$  – 22 кГц,  $k$  – 0.07 Н/м. Одной из причин хороших результатов, получаемых с использованием данного типа кантилевера, могли являться оптималь-

ные физико-химические характеристики, поскольку у этого типа кантилеверов наибольшая, хотя все равно низкая ригидность, и наибольшая среди используемых кантилеверов резонансная частота. Однако, вероятнее всего, основная причина максимальных «метаболических» нановибраций с наименьшим уровнем шума заключалась в присутствии только одного кантилевера, тогда как на двух других протестированных чипах сформирована «гребенка»: из двух кантилеверов в случае D-DNP ( $f_0$  – 12–24 кГц,  $k$  – 0.06 Н/м) и пяти кантилеверов – в случае С-MLCT ( $f_0$  – 4–

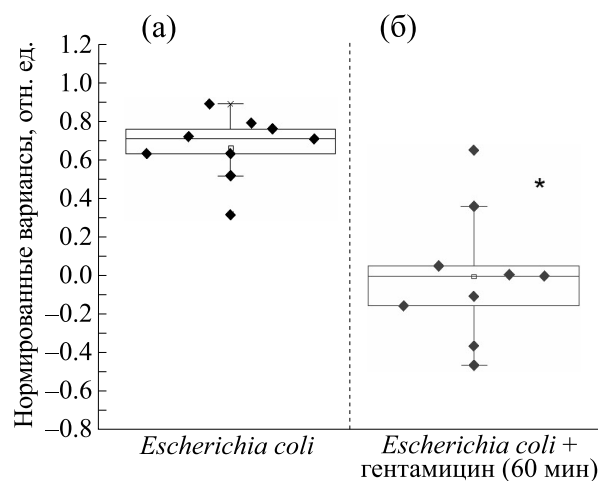


**Рис. 3.** Кривые нановибраций кантилевера: (а) – кантилевер с фиксированными на нем поли-L-лизином *E. coli*, (б) – кантилевер с фиксированными на нем поли-L-лизином *E. coli* после обработки цефтриаксоном (36 мг/мл).

10 кГц,  $k = 0.010$  Н/м). В этом случае наличие дополнительных кантилеверов вызывало появление дополнительных резонансных пиков на АЧХ возбуждаемых колебаний тестируемого кантиле-

вера, что приводило к увеличению уровня шума и маскировке полезного сигнала.

В результате фиксации *E. coli* на кантилевере через слабые взаимодействия наблюдается резкое



**Рис. 4.** Изменения вариансы DFL при нановибрациях кантилевера: (а) – статистический анализ по кантилеверам разных партий при фиксации на них 0.01%-м поли-L-лизином *E. coli*, (б) – после обработки *E. coli*, фиксированных на кантилевере гентамицином. \* – Различия статистически значимы ( $p < 0.05$ ).

усиление нановибраций, связанное с собственной метаболической активностью бактериальных клеток. Первоначально высказанная гипотеза о том, что усиление нановибраций кантилевера обусловлено двигательной активностью за счет жгутиков бактерий, оказалась несостоятельной, поскольку существенные изменения АЧХ зафиксированы и у безжгутиковых форм, например, у грамположительных бактерий — *Staphylococcus aureus*, дрожжеподобных грибов — *Candida albicans*, дрожжей — *Saccharomyces cerevisiae* [14]. В настоящее время доказанным считается факт, что усиление нановибраций кантилевера в присутствии всех видов микроорганизмов обусловлено именно метаболической активностью живых клеток. В случае гибели клеток и в отсутствие метаболических реакций нановибрации кантилевера возвращаются к исходному уровню. Именно это наблюдалось нами в случае воздействия на *E. coli* бактерицидных концентраций гентамицина сульфата, механизм действия которого обусловлен необратимым связыванием с 30S-субъединицей бактериальной рибосомы и блокадой синтеза бактериального белка. В то же время под воздействием цефтриаксона, механизм действия которого связан с нарушением синтеза пептидогликана клеточной стенки и аутолизом бактерий и для которого у данного штамма предварительно была определена резистентность, в ходе часовой инкубации не выявлено подавление жизнедеятельности бактерий.

Статистическая обработка варианты DFL у кантилеверов разных партий (но всегда кантилеверов А-MLCT) показала, что часовая экспозиция в растворе гентамицина сульфата вызывает статистически значимое падение в сравнении с вариантами DFL кантилеверов, на которых фиксированы бактерии без воздействия. Таким образом, выбранный критерий — варианта DFL — является информативным критерием, позволяющим оценивать чувствительность бактерий к антибиотикам.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что использование нановибраций кантилевера для детекции резистентности/чувствительности бактерий к антибиотикам является высокоэффективным, поскольку позволяет дать ответ о наличии антибиотикорезистентности в течение часа, в отличие от имеющихся в настоящее время в распоряжении бактериологических лабораторий методов определения чувствительности бактерий к антибиотикам, которые предоставляют информацию через несколько суток.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю признательность проф. Sandor Kasas — автору первичной идеи использования кантилеверов для регистрации антибиотикорезистентности бактерий.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-14-10179).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. N. A. Lermiaux and A. D. S. Cameron, *Can. J. Microbiol.* **65** (1), 34 (2019).
2. Р. В. Полибин, А. Я. Миндлина, А. А. Герасимов и др., *Эпидемиология и вакцинопрофилактика* **3** (94), 4 (2017).
3. Е. В. Наумкина, Е. В. Матущенко, О. А. Абросимова и др., *Клинич. лабораторная диагностика* **63** (2), 113 (2018).
4. Ю. Б. Белан и М. Б. Старикович, *Педиатрическая фармакология* **4** (4), 42 (2007).
5. J. Piret and G. Boivin, *Curr. Opin. Infect. Dis.* **29** (6), 654 (2016).
6. Л. М. Иванова, Е. П. Баранцевич и Е. В. Шляхто, *Проблемы мед. микологии* **13** (1), 14 (2011).
7. M. R. Hassett, B. E. Riegel, P. S. Callaghan, et al., *Biochemistry* **56** (41), 5615 (2017).
8. P. Stupar, O. Opota, G. Longo, et al., *Clin. Microbiol. Infection* **23**, 400 (2017).
9. A. Boisen, S. Dohn, S. S. Keller, et al., *Rep. Prog. Phys.* **74** (3), 1 (2011).
10. J. Tamayo, P. M. Kosaka, J. J. Ruz, et al., *Chem. Soc. Rev.* **3**, 1 (2013).
11. S. Aghayee, C. Benadiba, J. Notz, et al., *J. Mol. Recognit.* **JMR 26** (11), 590 (2013).
12. С. Н. Плескова, Р. Н. Крюков, С. З. Бобык и др., *Биофизика* **65** (1), 80 (2020).
13. S. N. Pleskova, E. R. Mikheeva, and E. E. Gornostayeva, *Micron* **105**, 82 (2018).
14. R. G. Willaert, P. V. Boer, A. Malovichko, et al., *Sci. Advances* **6** (26), 1 (2020).

## **Nanovibrations of Atomic Force Microscope Cantilevers as a System for Real Time Detection of Antibiotic Resistance in Bacteria**

**S.N. Pleskova<sup>\*, \*\*</sup>, O.I. Fomichev<sup>\*</sup>, R.N. Kriukov<sup>\*</sup>, and I.S. Sudakova<sup>\*\*</sup>**

*\*National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, prosp. Gagarina 23/3, Nizhni Novgorod, 603950 Russia*

*\*\*Nizhny Novgorod State Technical University named after R.E. Alekseev, ul. Minina 24/1, Nizhni Novgorod, 603950 Russia*

Atomic force microscopy was used for detection of cantilever nanovibrations as a result of the metabolic activity of *Escherichia coli*. Poly-L-lysine has been shown to be effective as an adhesion solution in promoting bacterial cell adhesion process onto the cantilever and has no effect on the metabolic activity of these bacteria. Analysis of variance has been used to track the resonance of the cantilevers: the cantilever which was functionalized with poly-L-lysine (control) and the cantilever with bacteria attached (experiment). The amplitude measures were analyzed, and it was found that there was a statistically significant difference between the averages. It has been demonstrated that the methods used in clinical practice for detecting bacteria and measuring their response to antibiotics require a few days, whereas in contrast atomic force microscopy would permit one to assess the susceptibility of the microorganism for antibiotics within an hour..

*Keywords: atomic force microscopy, antibiotic resistance, nanovibrations, cantilever, bacteria, antibiotics*