

DOI: 10.7868/S3034574X26040046

Оригинальная статья

УДК 579.6

ОЦЕНКА ВОЗДЕЙСТВИЯ АМПИЦИЛЛИНА НА БАКТЕРИАЛЬНЫЕ БИОПЛЕНКИ С ПОМОЩЬЮ КОМПАКТНОГО АНАЛИЗАТОРА НА ОСНОВЕ РЕЗОНАТОРА С ПОПЕРЕЧНЫМ ЭЛЕКТРИЧЕСКИМ ПОЛЕМ

О.И. Гулий^{1,*}, Б.Д. Зайцев², О.А. Караваева¹,
С.С. Евстигнеева^{1,3}, А.А. Широков¹, А.А. Теплых², И.А.Бородина²

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов — обособленное структурное подразделение
Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук»
(ИБФРМ РАН), Саратов, Российская Федерация

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт радиотехники и электроники
им. В.А. Котельникова Российской академии наук, Саратовский филиал (СФ ИРЭ им. В.А. Котельникова РАН),
Саратов, Российская Федерация

³Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского, Саратов,
Российская Федерация

*E-mail: guliy_olga@mail.ru

Аннотация. Впервые проведены исследования по оценке восприимчивости бактериальных клеток в составе биопленок к антибиотику с помощью компактной акустической сенсорной системы на основе резонатора с поперечным электрическим полем. Установлено, что показателем активности антибиотика в отношении бактерий является изменение аналитического сигнала сенсорной системы для бактерий в биопленочной форме после воздействия антибиотика. Полученные результаты подтверждены данными микробиологического посева и микроскопии. Преимуществами подхода являются возможность многократного применения сенсорной системы во внелабораторных условиях и получение результата в короткий временной промежуток (в пределах 10 мин).

Ключевые слова: бактериальные клетки, биопленки, ампициллин, акустическая сенсорная система на основе резонатора с поперечным электрическим полем.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Минобрнауки РФ в рамках Государственных заданий ИБФРМ РАН (1240201000147-6) и ИРЭ им. В.А. Котельникова РАН (FFWZ-2025-0001).

Конфликт интересов. Авторы данной работы заявляют, что у них отсутствует конфликт интересов.

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи.

Ссылка для цитирования: Гулий О.И., Зайцев Б.Д., Караваева О.А., Евстигнеева С.С., Широков А.А., Теплых А.А., Бородина И.А. Оценка воздействия ампициллина на бактериальные биопленки с помощью компактного анализатора на основе резонатора с поперечным электрическим полем. *Прикладная биохимия и микробиология / Applied biochemistry and microbiology*. 2026. Т. 62. № 4. С. 556–566.
<https://doi.org/10.7868/S3034574X26040046>

EVALUATION OF THE EFFECT OF AMPICILLIN ON BACTERIAL BIOFILMS BY USING A COMPACT ANALYZER BASED ON A LATERAL ELECTRIC FIELD RESONATOR

O.I. Guliy^{1,*}, B.D. Zaitsev², O.A. Karavaeva¹, S.S. Evstigneeva^{1,3},
A.A. Shirokov¹, A.A. Teplykh², I.A. Borodina²

¹*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms – Subdivision of the Federal State Budgetary Research Institution Saratov Federal Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences (IBPPM RAS), Saratov, Russian Federation*

²*Kotelnikov Institute of Radio Engineering and Electronics, Russian Academy of Sciences, Saratov Branch, Saratov, Russian Federation*

³*Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky, Saratov, Russian Federation*

*E-mail: guliy_olga@mail.ru

Abstract. For the first time, studies were conducted to evaluate the susceptibility of bacterial biofilm cells to an antibiotic by using a compact acoustic sensor system based on a lateral electric field resonator. The antibiotic's activity against the bacteria was indicated by the change in the sensor system's analytical signal for the antibiotic-exposed biofilm bacteria. The results were confirmed by microbiological culturing and microscopy data. The advantages of this approach include the ability to repeatedly use the sensor system outside the laboratory and obtain results within a short period (10 min).

Key words: bacterial cells, biofilms, ampicillin, acoustic sensor system based on a lateral electric field resonator.

Funding. This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of the state assignments of the IBPPM RAS (1240201000147-6) and the V.A. Kotelnikov IRE RAS (FFWZ-2025-0001).

Conflict of interests. The authors of this work declare that they have no conflict of interest.

Authors contribution. All authors made significant contributions to the development of the concept, the research, and the preparation of the article.

For Citation: Guliy O.I., Zaitsev B.D., Karavaeva O.A., Evstigneeva S.S., Shirokov A.A., Teplykh A.A., Borodina I.A. Evaluation of the Effect of Ampicillin on Bacterial Biofilms by Using a Compact Analyzer Based on a Lateral Electric Field Resonator. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya / Applied biochemistry and microbiology*. 2026;62(4): 556–566. (In Russ.) <https://doi.org/10.7868/S3034574X26040046>

Несмотря на историческое документирование поверхностно-ассоциированных бактерий еще Антони ван Левенгуком (1684 г.), как самостоятельное явление биопленки были признаны лишь спустя три столетия. Терминологическое определение возникло в 1978 г., а официальное научное признание произошло в 1993 г. с принятием позиции Американского общества микробиологии [1]. Биопленки являются преимущественной формой существования бактерий в естественной среде обитания и представляют собой организованные микробные сообщества, погруженные во внеклеточный полимерный матрикс и прикрепленные к биотическим или абиотическим поверхностям. Формирование бактериальных биопленок является ключевым фактором, который необходимо учитывать при работе с культурами микроорганизмов. С одной стороны, образование биопленок помогает бактериям выживать под воздействием негативных факторов среды, но, с другой стороны, напрямую связано с распространением нозокомальных и внебольничных инфекций. Существование бактериальных биопленок признано одним из наиболее важных факторов развития стойких инфекций [4, 5, 15]. По современным оценкам, от 65 до 80% бактериальных инфекций обусловлены формированием микробных сообществ, которые являются одним из факторов патогенности и выживаемости возбудителей в организме [12]. Распространение инфекций, ассоциированных с биопленками, связано с отсутствием надежных методов определения их восприимчивости к антибиотикам. Примечательно, что бактерии демонстрируют разные физико-химические характеристики в планктонной и биопленочной формах. Такие различия определяют изменениями клеточного метаболизма при образовании биопленок, которые выражаются в продукции компонентов биополимерного матрикса, формировании покоящихся форм и др. Трансформация планктонных форм бактерий начинается практически сразу после колонизации биотических/абиотических поверхностей, в результате чего постепенно создается барьер, защищающий от воздействия негативных факторов, в том числе антибиотиков, и повышающий резистентность бактерий [14]. Из-за различий антибиотиковосприимчивости бактерий в планктонной и биопленочной формах, был разработан дополнительный параметр для оценки эффективности антибиотиков в виде минимальной концентрации, подавляющей рост биопленки и минимальной концентрации, уничтожающей биопленку [21].

Также разработано множество лабораторных методов для оценки антибиотикочувствительности биопленочной формы бактерий: анализ на микротитровальных планшетах, устройство Калгари, реакторы суспендирования субстрата и системы проточных кювет [3, 15, 17, 22]. Тем не менее,

определение и интерпретация параметров антибиотикочувствительности бактерий в составе биопленок различаются в разных публикациях. Более того, ни одно из официальных агентств, таких как EUCAST (Европейский комитет по определению чувствительности к антимикробным препаратам, Европа) или CLSI (Институт клинических и лабораторных стандартов, США), еще не предоставило стандартизированные параметры для определения чувствительности биопленок к антибиотикам. Поэтому разработка новых методов оценки восприимчивости микробных клеток в биопленочной форме к антибиотикам является весьма актуальным направлением для выбора рациональной антибиотикотерапии и оценки ее эффективности. Уникальную возможность для оценки воздействия антибиотиков на биопленочные бактериальные культуры представляют сенсорные системы, среди которых выделяются акустические платформы [7, 11]. Методы акустического анализа отличаются высокой чувствительностью и позволяют проводить исследования непосредственно в жидкости. Ранее были проведены исследования, демонстрирующие возможность оценки воздействия на микробные клетки в планктонной форме антибиотиков ампициллина [2], канамицина [9], амоксициллина [8], хлорамфеникола [23], полимиксина [10]. Цель работы — показать возможность использования компактной акустической сенсорной системы на основе резонатора с поперечным электрическим полем для оценки воздействия ампициллина на микробные клетки в составе биопленок.

МЕТОДИКА

Культуры клеток. В работе использовали штамм бактерий *Pseudomonas putida* TSh-18 (IBPPM 358), предоставленный коллекцией ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (<http://collection.ibppm.ru>). Для образования биопленок на поверхности раздела фаз «воздух—жидкость» исследуемый штамм культивировали в стационарных условиях при 30°C 4 сут. Непосредственно перед посевом в культуру добавляли водный раствор ампициллина (1 мг/мл) до конечных концентраций антибиотика 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 25,0, 50,0 мкг/мл.

Биопленочную культуру отделяли от планктонной формы с помощью крупноячеистого фильтра, затем клетки осаждали центрифугированием (13000×g, 5 мин), однократно отмывали и суспендировали в стерильной дистиллированной воде. Оптическую плотность клеточных суспензий доводили до 1,0 ед. при измерении на фотоэлектронном колориметре Specol (“Carl Zeiss”, ГДР) при длине волны 420 нм.

Фазово-контрастная микроскопия. Фазово-контрастную микроскопию биопленочной культуры до и после обработки ампициллином, а также измерение толщины биопленок проводили на лазерном

диссекторе Leica LMD 7000 («Leica Microsystems», Германия) в Центре коллективного пользования на научном оборудовании, предназначенном для работ в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии «Симбиоз» (ЦКП «Симбиоз») ИБФРМ РАН. Процедуру подготовки препаратов для микроскопии и их анализ выполняли в соответствии с описанной в работе [6, 19].

Определение жизнеспособности биопленок после обработки антибиотиком. В качестве антибактериального препарата в работе использовали ампициллин («Sigma», США). Оценка жизнеспособности биопленочной культуры после обработки антибиотиком выполнена в соответствии с руководством Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI) [16, 20] путем посева на плотную питательную среду после воздействия водного раствора ампициллина. В контроле подсчитывали количество колоний, выросших при посеве клеток без их обработки антибиотиком. Бактерии выращивали в термостате при температуре 30°C, и спустя сутки определяли количество образовавшихся колоний.

Флуоресцентная микроскопия биопленок. Для флуоресцентной микроскопии применяли конфокальный лазерный микроскоп TCS SP5 («Leica Microsystems», Германия) на базе ЦКП «Симбиоз» ИБФРМ РАН, как описано в работе [6]. Обработку полученных изображений проводили на рабочей станции конфокального микроскопа Leica TCS SP5 (Германия). Для флуоресцентной детекции живых и мертвых клеток в составе биопленки использовали набор Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit (L7007, «Thermo Fisher Scientific», USA). Для визуализации клеток проводили окрашивание по стандартному протоколу («Thermo Fisher Scientific»).

Для количественного анализа интенсивности сигнала от SYTO 9 и PI в биопленках использовалась программа ImageJ для обработки и анализа данных изображений. Площади и интенсивность флуоресценции специфических сигналов от красителей рассчитывались с помощью плагина «Анализ частиц» на вкладке «Анализ», который вычислял общую площадь и интенсивность флуоресценции SYTO 9 и PI в клетках биопленок. Во всех случаях анализировалось 10 полей зрения.

Описание датчика и методика экспериментов. Для анализа воздействия антибиотика на биопленки акустическими методами использовали разработанную ранее сенсорную систему [24], включающую жидкостный датчик и компактный анализатор импедансов. Жидкостный датчик представлял собой пьезоэлектрический резонатор с поперечным электрическим полем на основе пластины ниобата лития, совмещенный с жидкостным контейнером. Анализатор импеданса был создан на базе электронного конструктора Arduino («Smart Projects», Италия). Данный анализатор включал высокочастотный (ВЧ) цифровой гене-

ратор сигналов AD9850 с частотным диапазоном 0 – 62,5 МГц и выходным напряжением от 0 до 0,2 В. Частота генератора и выходное напряжение задавались внешним контроллером ATmega 328, который сопрягался с персональным компьютером. Последовательно соединенные резонатор с поперечным электрическим полем и известное активное сопротивление R подключались к выходу ВЧ генератора. Значения электрического напряжения на резонаторе и на сопротивлении R измерялись стандартными выпрямителями, связанными с вышеуказанным контроллером. Специально разработанная для анализатора программа вычисляла модуль электрического импеданса резонатора Z и позволяла строить его зависимость от частоты. Компактная акустическая сенсорная система, схема жидкостного датчика на основе резонатора с поперечным электрическим полем и общая схема проведения исследования представлены на рис. 1.

Для проведения измерений суспензию клеток в биопленочной форме разводили в буферном растворе с дистиллированной водой до конечной плотности 10^6 кл./мл и измеряли частотные зависимости модуля электрического импеданса датчика. Затем в суспензию с биопленками добавляли антибиотик. Аналитическим сигналом служило изменение модуля электрического импеданса датчика после добавления антибиотика к суспензии с биопленками. Объем измерительной ячейки составлял ~2 мл. Регистрация аналитического сигнала осуществлялась в течение ~5 мин. Все эксперименты проводились не менее пяти раз. Температура при проведении исследований поддерживалась на уровне 25°C.

Относительная погрешность результатов измерений исследуемых образцов составляла $\pm 2\%$, то есть при проведении нескольких экспериментов с одним и тем же взаимодействием суспензии биопленок с антибиотиком величина модуля электрического импеданса имела разброс значений на любой частоте в пределах $\pm 2\%$. Данные были статистически обработаны с помощью стандартных процедур, интегрированных в программное обеспечение Excel 2007.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Рост биопленок *P. putida* Tsh-18 на границе фаз «жидкость-воздух» наблюдали в течение 4 сут. Биопленки формировались уже на первые сутки в жидкой среде и со временем увеличивались их толщина и морщинистость (оценка проводилась визуально). Поскольку на данный момент отсутствуют общепринятые стандарты по определению плотности клеток в составе биопленок в работе при проведении исследований использовали культуры, выращенные в одинаковых условиях и в течение одного и того же промежутка времени (4 сут). Толщина биопленок составляла в среднем $47,8 \pm 3,1$ мкм.

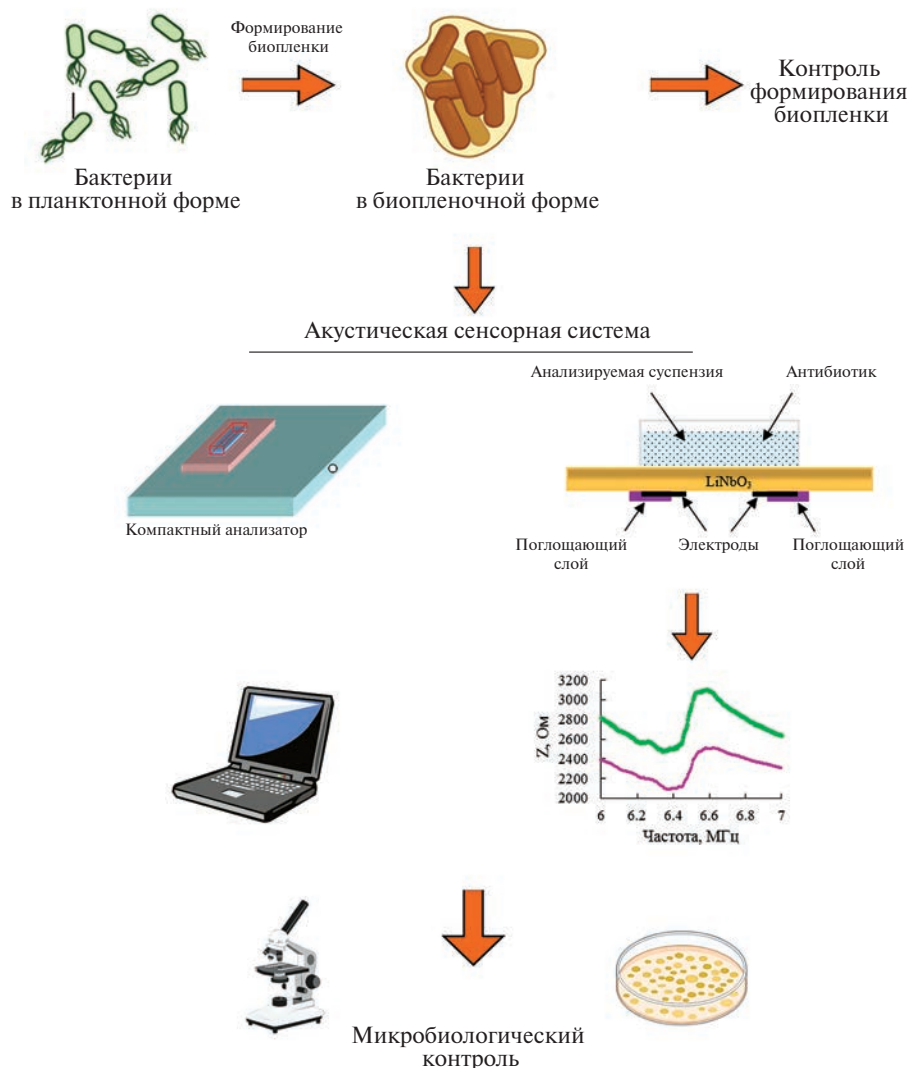


Рис. 1. Компактная акустическая сенсорная система, схема жидкостного датчика на основе резонатора с поперечным электрическим полем и общая схема проведения исследования

Fig. 1. Compact acoustic sensor system, liquid sensor circuit based on a transverse electric field resonator, and general research scheme

В работе исследовалась возможность оценки воздействия ампициллина на биопленочную культуру *P. putida* TSh-18 с помощью компактной акустической сенсорной системы. Выбор ампициллина обусловлен его принадлежностью к одной из наиболее многочисленных групп антибиотиков — бета-лактамов, уровень продаж которых занимает лидирующие позиции во всех странах мира [18]. Предварительно был проведен микробиологический анализ воздействия ампициллина на биопленочную культуру, в результате которого было установлено, что концентрация в пределах 0,5–25 мкг/мл практически не оказывала влияния на бактерии. Снижение численности бактерий наблюдалось, начиная с концентрации 50 мкг/мл.

Поскольку воздействие антибиотика может стимулировать развитие биопленки у бактерий,

в качестве дополнительного контроля проводился анализ изменения толщины биопленок в зависимости от концентрации ампициллина. При концентрациях ампициллина 1,0, 2,5, 5,0, 10,0 и 25,0 мкг/мл толщина биопленок увеличивалась по мере роста культуры, но существенных различий при добавлении ампициллина обнаружить не удалось. Изменения толщины биопленок не превышали предел погрешности и увеличение/уменьшение толщины по сравнению с контролем оказывались несущественными (за исключением концентрации 50 мкг/мл). Для концентрации антибиотика 50 мкг/мл было установлено, что толщина биопленок увеличивалась по сравнению с контролем в среднем на 30%. Полученные результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1. Количество клеток в составе биопленок и их толщина при воздействии ампициллина с разной концентрацией

Table 1. The number of cells in biofilms and their thickness when exposed to different ampicillin concentrations

Концентрация антибиотика, мкг/мл	KOE/мл (10^8)	Толщина биопленки, мкм
0	$8,4 \pm 2,1$	$47,8 \pm 3,1$
0,5	$8,0 \pm 1,7$	$45,3 \pm 5,2$
1,0	$8,1 \pm 1,8$	$40,7 \pm 6,1$
2,5	$8,5 \pm 2,5$	$48,1 \pm 5,4$
5,0	$7,9 \pm 2,8$	$39,8 \pm 7,6$
10,0	$8,6 \pm 1,5$	$45,1 \pm 4,4$
25,0	$7,9 \pm 2,6$	$46,5 \pm 3,5$
50,0	$2,2 \pm 0,3$	$60,3 \pm 5,8$

Полученные данные о воздействии ампициллина на биопленочные формы бактерий были подтверждены с помощью световой фазово-контрастной микроскопии, проведенной на лазерном диссекторе Leica LMD 7000. Выбор данного метода микроскопии обусловлен тем, что высокая числовая апертура линзовых объективов и короткая длина волны лазерного излучения обеспечивают получение изображений с высоким разрешением вдоль оптического и поперечного направлений и могут быть использованы для оценки воздействия антибиотиков на клетки [13]. На рис. 2 представлены данные для биопленочной суспензии клеток до и после воздействия ампициллина 10 (рис. 2а) и 50 (рис. 2б) мкг/мл. По результатам микроскопии видно, что изменения в биопленках наблюдались при концентрации 50 мкг/мл, при которой количество бактерий в поле зрения уменьшалось по сравнению с контролем (без воздействия антибиотика).

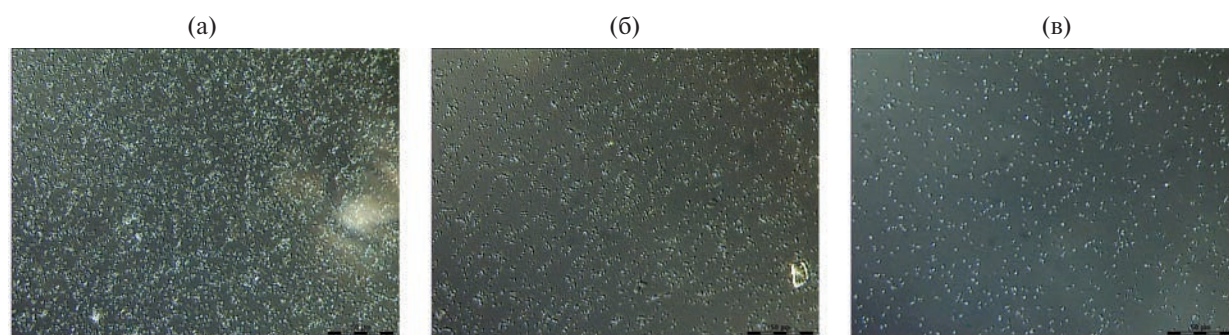


Рис. 2. Данные фазово-контрастной микроскопии для биопленочной формы бактерий до (а) и после воздействия ампициллина 10 (б) и 50 (в) мкг/мл. Использовали TL-DIC (дифференциально-интерференционный контраст) и увеличение $\times 40$

Fig. 2. Phase contrast microscopy data for the biofilm form of bacteria before (a) and after exposure to ampicillin at 10 (b) and 50 (c) $\mu\text{g/ml}$. TL-DIC (differential interference contrast) and a magnification of $\times 40$ were used

На следующем этапе исследовалась возможность оценки восприимчивости бактерий в биопленочной форме к антибиотику с концентрацией 10 и 50 мкг/мл с помощью акустической сенсорной системы. Исследования включали поиск оптимальной микробной нагрузки в измерительной ячейке и оптимального времени воздействия антибактериального препарата, а также определение подходящего интервала частот. В результате было показано, что внесение бактерий в биопленочной форме в количестве 10^6 кл./мл в измерительную ячейку с дистиллированной водой приводило к незначительному (в пределах погрешности измерений) изменению модуля электрического импеданса датчика (ΔZ) (рис. 3а). На частоте 6,6 МГц величина ΔZ была равна 6,29 Ом. Указанная частота 6,6 МГц выбрана произвольно, поскольку вблизи резонанса наблюдалось наибольшее изменение аналити-

ческого сигнала и для анализа можно выбирать любую частоту. В дальнейшем расчеты величины ΔZ будут проводиться именно на этой частоте 6,6 МГц. Также было показано, что добавление ампициллина в количестве 50 мкг/мл в измерительную ячейку с дистиллированной водой практически не приводило к изменению модуля электрического импеданса датчика (рис. 3б). Величина ΔZ составила 2,37 Ом на частоте 6,6 МГц.

Результаты исследования воздействия ампициллина в количестве 10 и 50 мкг/мл на бактерии в биопленочной форме, оценка которых проводилась с помощью акустического анализатора, представлены на рис. 4. Концентрация антибиотика выбрана на основе полученных результатов микробиологического анализа и фазово-контрастной микроскопии воздействия ампициллина на биопленочную культуру.

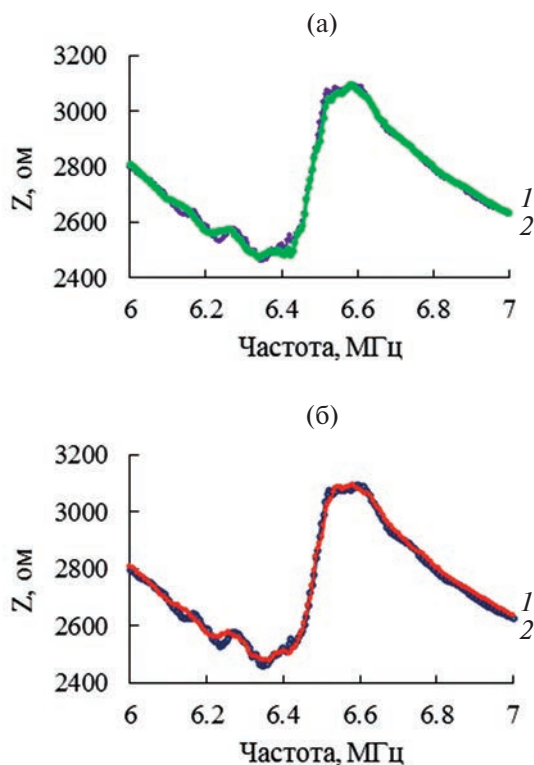


Рис. 3. Частотные зависимости модуля электрического импеданса акустического датчика с дистиллированной водой до (1) и после (2) добавления в измерительную ячейку бактериальных клеток в биопленочной форме (плотность 10^6 кл./мл) (а) и ампициллина с концентрацией 50 мкг/мл (б)

Fig. 3. Frequency dependencies of the electrical impedance module of an acoustic sensor with distilled water before (1) and after (2) adding bacterial cells in a biofilm form (density 10^6 cells/ml) (a) and ampicillin at a concentration of 50 µg/ml (b) to the measuring cell

Как видно из представленных данных, при использовании концентрации антибиотика 10 мкг/мл наблюдалось небольшое изменение модуля электрического импеданса резонатора ($\Delta Z = 52,8$ Ом на частоте 6,6 МГц), в то время как добавление ампициллина с концентрацией 50 мкг/мл вызывало значительное изменение модуля электрического импеданса ($\Delta Z = 581,64$ Ом на частоте 6,6 МГц).

Изменение модуля электрического импеданса резонатора при воздействии ампициллина с концентрацией 50 мкг/мл может быть обусловлено снижением количества жизнеспособных клеток вследствие разрушения клеточной стенки под действием антибиотика и выхода содержимого цитоплазмы в среду измерения. Это приводило к увеличению электрической проводимости из-

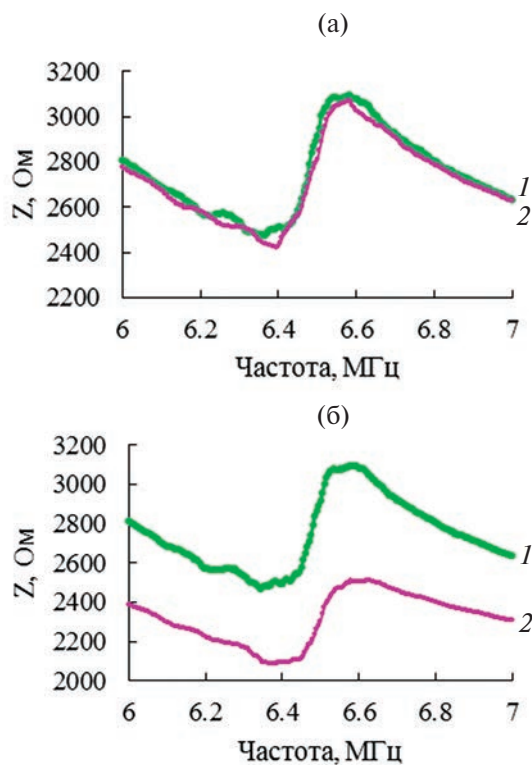


Рис. 4. Частотные зависимости модуля электрического импеданса акустического датчика до (1) и после (2) добавления в измерительную ячейку с микробными клетками в биопленочной форме (плотность 10^6 кл./мл) ампициллина (а) (10 мкг/мл) и (б) (50 мкг/мл)

Fig. 4. Frequency dependencies of the electrical impedance module of an acoustic sensor before (1) and after (2) adding ampicillin (a) (10 µg/ml) and (b) (50 µg/ml) to a measuring cell with microbial cells in a biofilm form (density 10^6 cells/ml)

меряемой суспензии, которое регистрировалось акустическим датчиком.

Таким образом, значительные изменения аналитического сигнала наблюдались при концентрации ампициллина 50 мкг/мл и при этой же концентрации зафиксировано существенное изменение количества жизнеспособных клеток с помощью микробиологического высева. Для контроля были проведены дополнительные исследования с помощью флуоресцентной микроскопии путем окрашивания LIVE/DEAD BacLight™ при воздействии ампициллина в той же концентрации (50 мкг/мл). Из представленных данных топографического анализа биопленки с помощью окраски LIVE/DEAD BacLight™ после воздействия ампициллина видно существенное уменьшение числа жизнеспособных клеток. На рис. 5 представлены конфокальные микрофотографии биопленок *P. putida* TSh-18,

окрашенных набором LIVE/DEAD BacLight для двух случаев.

1. Контрольная группа (без обработки антибиотиком). Наблюдалось однородное ярко-зеленое свечение (окраска SYTO 9), что визуально свидетельствует о высокой плотности живых бактериальных клеток с интактными мембранами. Красная флуоресценция (PI) практически отсутствует.

2. Опытная группа – обработка ампициллином в концентрации 50 мкг/мл. Флуоресценция с зондом SYTO 9 становилась менее интенсивной и неравномерной, при этом появлялось значительное количество клеток, светящихся красным цветом (PI). Это прямое визуальное свидетельство гибели клеток и повреждения их цитоплазматических мембран под действием антибиотика.

Данные флуоресцентной микроскопии служат прямым и наглядным подтверждением результатов, полученных с помощью акустического сенсора, в результате чего зафиксировано максимальное изменение электрического импеданса ($\Delta Z = 581,64 \text{ Ом}$) при концентрации 50 мкг/мл ампициллина. Микроскопия визуализирует причину этого изменения, обусловленного лизисом клеток, что сопровождается разрушением клеточной стенки и мембраны, в результате которого компоненты цитоплазмы попадают во внешнюю среду, что меняет ее электропроводность.

В табл. 2 представлены результаты количественного анализа изображений, представленных на рис. 5.

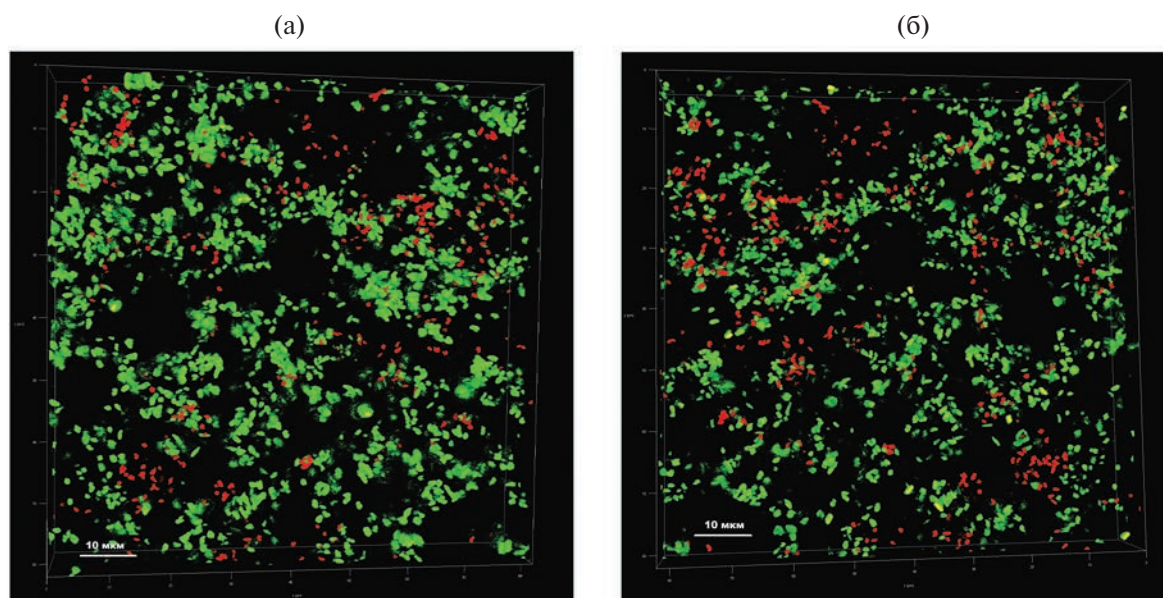


Рис. 5. Оценка жизнеспособности клеток биопленки с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии в отсутствие (а) и в присутствии (б) ампициллина: (50 мкг/мл) с использованием набора LIVE/DEAD BacLight для окрашивания. Зеленое окрашивание – живые клетки; красное окрашивание – мертвые клетки

Fig. 5. Assessment of biofilm cell viability using confocal laser scanning microscopy in the absence (a) and presence (b) of ampicillin: (50 µg/ml) using the LIVE/DEAD BacLight kit for staining. Green staining indicates live cells; red staining indicates dead cells

Таблица 2. Результаты количественного анализа интенсивности сигнала от SYTO 9 и PI в биопленках в отсутствие и в присутствии ампициллина: (50 мкг/мл), проведенного в программе ImageJ (усредненные данные по 10 полям зрения)

Table 2. Results of quantitative analysis of the signal intensity from SYTO 9 and PI in biofilms in the absence and presence of ampicillin (50 µg/ml), performed by ImageJ program (averaged data from 10 fields of view)

Концентрация, мкг/мл	Среднее значение интенсивности зонда Syto9	Среднее значение интенсивности зонда PI	Соотношение интенсивности сигнала между двумя зондами (Syto9/PI)
0	114,68	21,82	5,25557287
50	82,41	27,78	2,9665227

Интенсивность сигнала SYTO 9, который связывается с ДНК всех клеток, достоверно снизилась на 28% (со 114,68 до 82,41) после воздействия ампициллина. Это указывает на уменьшение общего количества клеток, способных удерживать краситель, что является следствием лизиса (разрушения) части бактерий. Интенсивность сигнала PI, проникающего только в клетки с поврежденными мембранами, возросла на 27% (с 21,82 до 27,78). Это прямое количественное доказательство бактерицидного действия ампициллина, приводящего к потере целостности мембраны. Наиболее информативным показателем является соотношение SYTO 9/PI. В контроле оно высокое (5,26), что характерно для популяции с преобладанием живых клеток. После воздействия антибиотика соотношение падает почти в 1,8 раза (до 2,97) и это отражает резкое увеличение доли мертвых клеток в общей биомассе.

Количественные данные, представленные в табл. 2 и визуальные доказательства, представленные на рис. 5, демонстрируют, что концентрация ампициллина 50 мкг/мл оказывала бактерицидное действие на биопленки *P. putida*, значительно увеличивая долю клеток с поврежденными мембранами. Эти результаты полностью согласуются

с показаниями акустической сенсорной системы, тем самым подтверждая ее как быстрый и надежный метод оценки эффективности антибиотиков против биопленок.

Таким образом, на основании полученных данных показана возможность применения компактной акустической сенсорной системы для индикации воздействия ампициллина на бактериальные клетки в биопленочной форме. Применение сенсорной системы позволяет в короткие временные промежутки (время анализа не превышает 10 мин) сделать вывод о восприимчивости биопленочной формы бактерий к ампициллину в режиме реального времени. Поскольку аналитическим сигналом при проведении исследований является разница между регистрируемым сигналом датчика до и после воздействия антибиотика, можно не стандартизировать процесс образования микробного сообщества. Полученные результаты являются перспективными и имеют практическую направленность, поскольку могут служить основой для дальнейшей разработки автоматизированной акустической сенсорной платформы при оценке чувствительности биопленочной формы бактерий к антибиотикам.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Bjarnsholt T. Introduction to biofilms, in *Biofilm Infections*. Bjarnsholt T., Jensen P.Ø., Moser C., Hoiby N. (Eds.), Springer, New York, NY, 2011, pp. 1–9.
2. Borodina I.A., Zaitsev B.D., Alsowaidi A.K.M., Karavaeva O.A., Guliy O.I. A biological sensor based on the acoustic slot mode using microbial cells for the determination of ampicillin. *Acoustical Physics*, 2022, vol. 68, no. 6, P. 537–541. <https://doi.org/10.1134/S1063771022060021>.
3. Cruz C.D., Shah S., Tammela P. Defining conditions for biofilm inhibition and eradication assays for Gram-positive clinical reference strains. *BMC Microbiology*, 2018, vol. 18, no. 1, P. 173. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1321-6>.
4. Guliy O.I., Evstigneeva S.S. Bacterial communities and their role in bacterial infections. *Frontiers in Bioscience (Elite Ed)*, 2024, vol. 16, no. 4, P. 36. <https://doi.org/10.31083/j.fbe1604036>.
5. Guliy O.I., Evstigneeva S.S., Bunin V.D., Fedonenko Y.P. The role of biofilms and multidrug resistance in wound infections. In *Bioengineered Nanomaterials for Wound Healing and Infection Control*. 1st Edition. Barabadi H., Saravanan M., Mostafavi E., Vahidi H., 2023, Chapter 3, P. 57–114. Woodhead Publishing Series in Biomaterials, Cambridge, MA 02139, United States. Kidlington, OX5 1GB, United Kingdom. ISBN: 978-0-323-95376-4 (print) ISBN: 978-0-323-95835-6 (online). <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95376-4.00001-0>.
6. Guliy O.I., Evstigneeva S.S., Shirokov A.A., Bunin V.D. Sensor system for analysis of biofilm sensitivity to ampicillin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2024, vol. 108, P. 172. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12831-7>.
7. Guliy O.I., Zaitsev B.D., Borodina I.A. Electroacoustic biosensor systems for evaluating antibiotic action on microbial cells. *Sensors*, 2023, vol. 23, P. 6292. <https://doi.org/10.3390/s23146292>.
8. Guliy O.I., Zaitsev B.D., Larionova O.S. et al. Analysis of amoxicillin's antibacterial activity using biological sensor with clt acoustic wave. *Antibiotics and Chemotherapy*, 2021, vol. 66, no. 1–2, P. 12–18. <https://doi.org/10.24411/0235-2990-2021-66-1-2-12-18>.
9. Guliy O.I., Zaitsev B.D., Semyonov A.P. et al. Microbial acoustic sensor test-system based on a piezoelectric resonator with a lateral electric field for kanamycin detection in liquid. *Ultrasonics*, 2022, vol. 120, P. 106651. <https://doi.org/10.1016/j.ultras.2021.106651>.
10. Guliy O.I., Zaitsev B.D., Shikhabudinov A.M. et al. Determination of microbial sensitivity to polymyxin by the method of electroacoustic Analysis. *Antibiotics and chemotherapy*, 2017, vol. 62, no. 3–4, P. 3–9. <https://doi.org/10.24411/0235-2990-2017-00031>.

11. Guliy O.I., Zaitsev B.D., Smirnov A.V., Karavaeva O.A., Borodina I.A. Prospects of acoustic sensor systems for antibiotic detection. *Biosensors and Bioelectronics: X*, 2022, vol. 12, P. 100274. <https://doi.org/10.1016/j.biosx.2022.100274>.
12. Jamal M., Ahmad W., Andleeb S. *et al.* Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association*, 2018, vol. 81, P. 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012>.
13. Johnson W.L., France D.C., Rentz N.S., Cordell W.T., Walls F.L. Sensing bacterial vibrations and early response to antibiotics with phase noise of a resonant crystal. *Scientific Reports*, 2017, vol. 7, P. 12138. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12063-6>.
14. Khatoun Z., McTiernan C.D., Suuronen E.J., Mah T.F., Alarcon E.I. Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon*, 2018, vol. 4, no. 12, P. e01067. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e01067>.
15. Macià M.D., Rojo-Molinero E., Oliver A. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*, 2014, vol. 20, P. 981–990. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12651>.
16. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for Bacteria that grow aerobically, approved standard. 9th ed. *CLSI document M07-A9*. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.
17. Rafaque Z., Abid N., Liaqat N. *et al.* In-vitro investigation of antibiotics efficacy against uropathogenic *Escherichia coli* biofilms and antibiotic induced biofilm formation at sub-minimum inhibitory concentration of ciprofloxacin. *Infection and Drug Resistance*, 2020, vol. 13, P. 2801–2810. <https://doi.org/10.2147/IDR.S258355>.
18. Sales of Veterinary Antimicrobial Agents in 31 European Countries in 2022' (EMA/299538/2023). Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2023. <https://doi.org/10.2809/895656>.
19. Shelud'ko A.V., Filip'echeva Yu.A., Shumilova E.M. *et al.* Changes in biofilm formation in the nonflagellated FLHB1 mutant of *Azospirillum brasilense* Sp245. *Microbiology (Moscow)*, 2015, vol. 84, no. 2, P. 144–151. <https://doi.org/10.1134/S0026261715010129>.
20. Stepanovic S., Vukovic D., Hola V. *et al.* Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 2007, vol. 115, no. 8, P. 891–899. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x.
21. Struthers J.K. The Use of a continuous culture system to study the antimicrobial susceptibility of bacteria in biofilm. *Methods in Molecular Medicine*, 2000, vol. 48, P. 215–225. <https://doi.org/10.1385/1-59259-077-2:215>.
22. Thieme L., Hartung A., Tramm K. *et al.* MBEC Versus MBIC: the lack of differentiation between biofilm reducing and inhibitory effects as a current problem in biofilm methodology. *Biological Procedures Online*, 2019, vol. 21, P. 18. <https://doi.org/10.1186/s12575-019-0106-0>.
23. Zaitsev B., Borodina I., Alsowaidi A. *et al.* Microbial acoustical analyzer for antibiotic indication. *Sensors*, 2022, vol. 22, P. 2937. <https://doi.org/10.3390/s22082937>.
24. Zaitsev B.D., Borodina I.A., Teplykh A.A. Compact liquid analyzer based on a resonator with a lateral excitation electric field. *Ultrasonics*, 2022, vol. 126, P. 106814. <https://doi.org/10.1016/j.ultras.2022.106814>.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Гулий Ольга Ивановна — доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов — обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук» (ИБФРМ РАН), Саратов, Российская Федерация
E-mail: guliy_olga@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0541-0020>

Зайцев Борис Давыдович — доктор физико-математических наук, профессор, главный научный сотрудник, Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова Российской академии наук, Саратовский филиал (СФ ИРЭ им. В.А. Котельникова РАН), Саратов, Российская Федерация
E-mail: zai-boris@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1859-0673>

ABOUT THE AUTHORS

Guliy, Olga I. — Doctor of Biological Sciences, Professor, Leading Researcher, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms—Subdivision of the Federal State Budgetary Research Institution Saratov Federal Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences (IBPPM RAS), Saratov, Russian Federation
E-mail: guliy_olga@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0541-0020>

Zaitsev, Boris D. — Doctor of Physical and Mathematical Sciences, Professor, Chief researcher, Kotelnikov Institute of Radio Engineering and Electronics, Russian Academy of Sciences, Saratov Branch, Saratov, Russian Federation
E-mail: zai-boris@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1859-0673>

Караваяева Ольга Александровна — кандидат биологических наук, научный сотрудник, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов — обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук» (ИБФРМ РАН), Саратов, Российская Федерация
E-mail: helga1121@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0665-1846>

Евстигнеева Стелла Сергеевна — кандидат биологических наук, научный сотрудник, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов — обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук» (ИБФРМ РАН), Саратов, Российская Федерация; доцент кафедры биохимии и клинической лабораторной диагностики, Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского Минздрава России, Саратов, Российская Федерация
E-mail: stels20295@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6789-7324>

Широков Александр Александрович — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, руководитель Центра коллективного пользования «Симбиоз», Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов — обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук» (ИБФРМ РАН), Саратов, Российская Федерация
E-mail: shirokov_a@ibppm.ru; shirokovaa@sgu.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4321-735X>

Теплых Андрей Алексеевич — кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник, Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова Российской академии наук, Саратовский филиал (СФ ИРЭ им. В.А. Котельникова РАН), Саратов, Российская Федерация
E-mail: teplykhaa@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1743-170X>

Бородина Ирина Анатольевна — кандидат физико-математических наук, ведущий научный сотрудник, Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова Российской академии наук, Саратовский филиал (СФ ИРЭ им. В.А. Котельникова РАН), Саратов, Российская Федерация
E-mail: borodinaia@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4136-7517>

Karavaeva, Olga A. — Ph.D. (Biological Sciences), Research Scientist, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms—Subdivision of the Federal State Budgetary Research Institution Saratov Federal Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences (IBPPM RAS), Saratov, Russian Federation
E-mail: helga1121@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0665-1846>

Evstigneeva, Stella S. — Ph.D. (Biological Sciences), Research Scientist, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms — Subdivision of the Federal State Budgetary Research Institution Saratov Federal Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences (IBPPM RAS), Saratov, Russian Federation; Associate Professor of the Department of Biochemistry and Clinical Laboratory Diagnostics, Saratov State Medical University of V.I. Razumovsky, Ministry of Health of the Russian Federation, Saratov, Russian Federation
E-mail: stels20295@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6789-7324>

Shirokov, Alexander A. — Ph.D. (Biological Sciences), Senior Research Scientist, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms — Subdivision of the Federal State Budgetary Research Institution Saratov Federal Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences (IBPPM RAS), Head of Simbioz Center for the Collective Use of Research Equipment (IBPPM RAS, Saratov, Russia), Saratov, Russian Federation
E-mail: shirokov_a@ibppm.ru; shirokovaa@sgu.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4321-735X>

Teplykh, Andrey A. — Ph.D. (Physical and Mathematical Sciences, Senior Research Scientist), Kotelnikov Institute of Radio Engineering and Electronics, Russian Academy of Sciences, Saratov Branch, Saratov, Russian Federation
E-mail: teplykhaa@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1743-170X>

Borodina, Irina A. — Ph.D. (Physical and Mathematical Sciences, Senior Research Scientist), Kotelnikov Institute of Radio Engineering and Electronics, Russian Academy of Sciences, Saratov Branch, Saratov, Russian Federation
E-mail: borodinaia@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4136-7517>

Поступила в редакцию 12.02.2026

После доработки 30.03.2026

Принята к публикации 05.04.2026

Received February 12, 2026

Revised March 30, 2026

Accepted April 05, 2026