

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КРЫМСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМ. В.И. ВЕРНАДСКОГО»
Ордена Трудового Красного Знамени
Медицинский институт им. С.И. Георгиевского

ОСМАНОВА СЕЛИНА ЯГЪЯЕВНА
**РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ОЦЕНКИ АНТИМИКРОБНОЙ
АКТИВНОСТИ АНТИБИОТИКОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ БАКТЕРИЙ**

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Аспирант 3-го года обучения кафедры медицинской и фармацевтической химии

Специальность: 30.06.01 «Фундаментальная медицина»

Профиль подготовки: 03.01.04 «Биохимия»

Научный руководитель
доктор биологических наук,
профессор А.М. Кацев

г. Симферополь, 2024 г.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ АНТИБИОТИКОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	14
1.1 Микробиологические методы.....	14
1.1.1 Лабораторные исследования в клинической микробиологии.....	14
1.1.2 Микробиологический контроль качества лекарственных препаратов.....	18
1.2 Билюминесцентный анализ.....	22
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	29
2.1 Предмет и объект исследования.....	29
2.2 Оборудование	30
2.3 Методы исследования.....	30
2.3.1 Определение антимикробной активности методом диффузии в агар	31
2.3.2 Определение антимикробной активности антибиотиков по измерению изменения интенсивности бактериальной билюминесценции.....	34
2.3.3 Статистическая обработка данных.....	34
ГЛАВА 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ АНТИБИОТИКОВ МЕТОДОМ ДИФФУЗИИ В АГАР.....	36
3.1 Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар с использованием в качестве тест-объектов <i>S. aureus</i> 209 P...	36
3.2 Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар с использованием в качестве тест-объектов <i>B. subtilis</i> ATCC 6633	39
3.3 Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар с использованием в качестве тест-объектов грамотрицательных бактерий <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	43
3.4 Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар с использованием в качестве тест-объектов природного тест-штамма бактерий <i>P. leiognathi</i> Sh1	49

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ АНТИБИОТИКОВ ПО ИЗМЕРЕНИЮ ИЗМЕНЕНИЯ ИНТЕНСИВНОСТИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ.....	54
4.1 Определение антимикробной активности антибиотиков по измерению изменения интенсивности бактериальной биолюминесценции <i>P. leiognathi</i> Sh1	54
4.2 Валидация разработанной методики биотестирования антибиотиков на наличие антимикробной активности.....	57
4.3 Алгоритм выполнения методики определение антимикробной активности антибиотиков по измерению изменения интенсивности бактериальной биолюминесценции	59
4.4 Разработка проекта общей фармакопейной статьи «Определение антимикробной активности антибиотиков по измерению изменения интенсивности бактериальной биолюминесценции тест-штамма».....	61
ВЫВОДЫ.....	72
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	75
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	77

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Лекарственные препараты (ЛП) являются источником повышенной опасности [Preuss C.V., Kalava A., 2023], так как неконтролируемый прием может вызвать отравление, аллергические реакции, привести к развитию зависимости или серьезным побочным эффектам [Саргсян Л.А, Малхасян А.Г., 2017]. Одними из важнейших лекарственных средств, позволяющие решить основные проблемы со здоровьем, согласно Всемирной организации здравоохранения, являются антибиотики [World Health Organization, 2023]. Согласно данным Минздрава Российской Федерации (РФ), за 2023 год антибиотики принимали более 54% населения, из них около половины занимались самолечением [Чигрина В.П., Тюфилин Д.С. и соавт., 2023]. Помимо этого, в РФ за 2023 год наблюдается устойчивый рост фальсифицированных лекарственных средств, что, в свою очередь, также ставит под угрозу состояние и безопасность граждан, поскольку «поддельные» препараты не проходят должный контроль качества и могут содержать опасные для здоровья вещества [Шведова И.Д., 2023; Пожилова Е.В., Новиков В.Е. и соавт., 2020]. Поэтому обеспечение их безопасности и эффективности, а именно, проведение контроля качества ЛП, является одним из приоритетных направлений системы здравоохранения.

Антибиотиками являются вещества биологического, полученных с помощью живых микроорганизмов, или синтетического происхождения, которые способны ингибировать рост или вызывать гибель микроорганизмов [Регистр лекарственных средств России РЛС, 2003; Bentley R. et al., 2003]. Согласно нормативно-технической документации, а именно Государственной Фармакопее (ГФ) XV и XIV изданий, контроль качества антибиотиков осуществляют с помощью высокоэффективной хроматографии и микробиологическими методами [ГФ РФ, XV и XIV издания]. Сущностью микробиологических подходов является оценка антимикробной активности, т.е. способности убивать микроорганизмы или ингибировать их рост и

размножение [Merriam-Webster.com Dictionary, Merriam-Webster, 2024]. Количественно активность антибиотиков выражается в единицах действия (ЕД) или микрограммах (мкг) [ГФ РФ, XIV издание].

Наибольшее распространение в оценке качества антибиотиков нашли диффузионные подходы, такие как Е-тесты, диффузия из лунок в агаре, из агаровых блоков и дисков, а также метод серийных разведений и турбидиметрия [Balouiri M., 2016]. Согласно ГФ XIV издания, для определения антимикробной активности антибиотиков рекомендуют метод диффузии в агар [ГФ РФ, XIV издание], основанном на сравнении размеров зон угнетения роста микроорганизмов, которые образуются при внесении в лунки испытуемых концентраций. Метод диффузии в агар является довольно трудоемким, так как включает в себя подготовку и поддержание чашек с агаром. Кроме того, в сравнении с современными физико-химическими методами, подход требует соблюдения более строгих условий исследования, так как на результаты могут повлиять качество питательных сред и реагентов [Сухорукова М.В., 2013].

Помимо этого, фармакопейная методика предполагает использование в качестве тест-объектов бактерий, которые, в соответствии с санитарными правилами РФ, отнесены к IV группе патогенности [СанПиН 3.3686-21, 2021]. В эту группу входят возбудители бактериальных септицемий, менингитов, пневмоний, энтеритов, токсикоинфекций и острых отравлений [Голубев С.И., 2020], для работы с которыми требуются особые условия, установленные СанПиНом 3.3686-21.

Альтернативой диффузионным методам могут выступать подходы, основанные на явлении бактериальной биолюминесценции, первые упоминания о которой представлены еще в работах XX века [Дерябин Д.Г., 2009]. Анализ с использованием биолюминесцентных микроорганизмов основан на измерении светоизлучения, которое образуется в результате ферментативной реакции, катализируемой люциферазой [Дерябин Д.Г., 2009]. Свет, излучаемый бактериями, легко и с высокой точностью

измеряется при помощи современной электронно-оптической техники [Medvedeva S.E., 2009]. Основными преимуществами метода являются простота использования, быстрота получения результатов анализа и высокая чувствительность к действию веществ различной химической природы [Dai Y., Chen D. et al., 2020; L. Simon et al., 2001].

Биолюминесцентный анализ, являющийся одним из перспективных экспрессных методов оценки качества окружающей среды, может стать основой для создания новой методики и подходов для определения антимикробной активности биологически активных веществ, аналогов которых нет на территории РФ.

Исходя из вышеперечисленного, актуальность темы исследования обусловлена необходимостью разработки методики, позволяющей определять антимикробную активность антибиотиков по измерению изменения интенсивности люминесценции.

Степень разработанности темы и научная проблема. Для определения антимикробной активности антибиотиков в ГФ РФ XIV издания описан метод диффузии в агар [ГФ РФ, XIV издание]. Однако, проведение испытания достаточно трудоемко, а получаемые результаты зависят от состава питательных сред, тест-штаммов микроорганизмов, химической природы исследуемого антибиотика и др. [Nijs, A. et al., 2003; Lalitha M.K., 2004; Игнатенко А.В., 2012]. Метод диффузии в агар требует наличие у исследователя микробиологических навыков работы с патогенными микроорганизмами, так как подразумевает использование в качестве тест-объектов бактерий, способных вызывать инфекционный процесс при проникновении в организм человека [СанПиН 3.3686-21, 2021; Голубев С.И., 2020].

Известны работы Girotti S., 2018; Berglind R., 2010; Jiang L., 2010; Yao Z., 2019; Chen F., 2020 и др., где в качестве объектов исследования выступают биолюминесцентные бактерии, являющиеся условно-патогенными. Помимо этого, штаммы являются общеизвестными системами

и основой для многих методов оценки экологического состояния окружающей среды, например, в работах Mariani L., 2020; Czech B., 2019; Aguirre-Martínez G.V., 2015; de Vasconcelos E.C., 2017; Iqbal M., Ghaffar A., Abbas M., Adil M. and etc., 2018; Blanco et al., 2017; Boehler et al., 2017; Zappi D., 2021 и др. Известно практическое использование авторами, Jawhara S., Mordon S., 2004; Spina-Cruz M., Maniero M.G., 2017, 2019; Vojtek L., 2014; Robinson G., 2011; Кацев А.М., 2019-2024 и др., светящихся бактерий для определения биологической активности, в том числе выявления антимикробных свойств. Недостатком является тот факт, что эти исследования не оценивают качество антибиотиков по измерению изменения интенсивности свечения люминесценции. Также следует отметить, что в ГФ РФ XIV издания нет общей фармакопейной статьи (ОФС), посвященной исследованию веществ по измерению изменения интенсивности свечения люминесценции.

Объект исследования. Тест-штаммы микроорганизмов рекомендованные ГФ РФ XIV издания *Staphylococcus aureus* 209 P и *Bacillus subtilis* ATCC 6633, грамотрицательные *Escherichia coli* ATCC 25922 и природные люминесцентные бактерии *Photobacterium leiognathi* Sh1, выделенные из Азовского моря.

Предмет исследования. Антимикробная активность 10 фармацевтических субстанций (ФС) антибиотиков, полученных от Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA): производные 6-аминопенициллановой кислоты – пенициллин G; нафтацена – доксициклина и тетрациклина гидрохлориды; аминогликозидов – гентамицина и стрептомицина сульфаты; макролиды (15-членные азалиды) – азитромицин; 7-аминоцефалоспоровой кислоты – цефазолина натриевая соль, цефепима дигидрохлорид моногидрат, цефтриаксона динатриевая соль и цефуроксима натриевая соль.

Цель работы: разработка методик оценки антимикробной активности с использованием природных биолюминесцентных бактерий.

Задачи работы:

1. Оценить антимикробную активность антибиотиков методом диффузии в агар, где в качестве объектов выступают штаммы микроорганизмов, рекомендованные ГФ РФ XIV издания, грамотрицательные модельные и биолюминесцентные бактерии.
2. Разработать методику определения антимикробной активности антибиотиков по изменению интенсивности люминесценции.
3. Изучить антимикробную активность антибиотиков в отношении биолюминесцентного тест-штамма по изменению интенсивности люминесценции.
4. Разработать проект общей фармакопейной статьи «Определение антимикробной активности антибиотиков по изменению интенсивности бактериальной биолюминесценции тест-штамма».

Научная новизна

По результатам определения антимикробной активности 10 антибиотиков впервые установлены линейные взаимосвязи по их влиянию на грамотрицательные модельные *E. coli* ATCC 25922 микроорганизмы и природные люминесцентные бактерии *P. leiognathi* Sh1, выделенные из Азовского моря. Проведено сравнение полученных результатов с данными по определению антимикробной активности в отношении рекомендованных ГФ РФ XIV издания тест-штаммов.

Впервые изучена антимикробная активность антибиотиков в отношении биолюминесцентных бактерий *P. leiognathi* Sh1 по измерению изменения интенсивности люминесценции, которые характеризовались уменьшением свечения при увеличении концентраций исследуемого вещества в пробе.

Научно обоснована применимость методики определения антимикробной активности антибиотиков по изменению интенсивности люминесценции путем валидационной оценки по показателям: предел обнаружения, предел количественного определения, аналитическая область,

линейность, правильность и промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность.

Для методики определения антимикробной активности антибиотиков по измерению свечения *P. leiognathi* Sh1, выраженное биолюминесцентным индексом (БЛИ, %), определены оптимальные условия культивирования, обнаружения люминесценции, растворители, количество бактерий и диапазон концентраций, позволяющий определить отношение аналитического сигнала к определяемой величине.

Разработан проект общей фармакопейной статьи «Определение антимикробной активности антибиотиков по изменению интенсивности бактериальной биолюминесценции тест-штамма».

Теоретическое и практическое значение. Проведена сравнительная оценка антимикробной активности антибиотиков в отношении микроорганизмов, рекомендованных ГФ РФ XIV издания, грамтрицательных модельных и биолюминесцентных бактерий. Предложена методика определения антимикробной активности антибиотиков по измерению изменения интенсивности люминесценции. Впервые разработана ОФС «Определение антимикробной активности антибиотиков по изменению интенсивности бактериальной биолюминесценции тест-штамма».

Методологическая основа исследования. Методология исследования построена на анализе и суммировании литературных данных, существующих на сегодняшний день, об использовании биолюминесцентных тест-систем для оценки биологической и антимикробной активности. Разработка методики основывалась на выборе условий определения антимикробной активности антибиотиков различных химических структур в отношении микроорганизмов, рекомендованных ГФ РФ XIV издания, грамтрицательных модельных и биолюминесцентных бактерий, а также подборе диапазона действующих концентраций.

Обработку результатов осуществляли с помощью программы Microsoft Excel 2016. Валидацию разработанной методики осуществляли на основании требований, установленные фармакопейной статьей ОФС.1.1.0021.18 «Валидация микробиологических методик», по параметрам: предел обнаружения, предел количественного определения, аналитическая область, линейность, правильность и промежуточную (внутрилабораторную) прецизионность. Метрологические характеристики результатов эксперимента оценивали согласно ОФС.1.1.0014.15 «Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами». Результаты каждого анализа подвергались статистической обработке с использованием программы STATISTICA 10.0 (Statsoft Inc., USA).

Связь задач исследования с планами научных работ. Выпускная квалификационная работа выполнялась согласно плану научной работы кафедры медицинской и фармацевтической химии Института биохимических технологий, экологии и фармации ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского».

Степень достоверности и апробация результатов. По теме исследования опубликовано 10 публикаций, 9 из которых включены в Российский индекс научного цитирования (РИНЦ Author ID: 1118136), 3 – в научных журналах, включенных в перечень ВАК, 1 – опубликована в изданиях, индексируемых в базе данных Scopus.

Результаты исследования были доложены на всероссийских и локальных конференциях:

1. Османова, С.Я. Сравнение метода диффузии в агар и биолюминесцентного анализа для определения антимикробной активности антибиотиков [Текст] / С.Я. Османова // Химия и технология биологически активных веществ для медицины и фармации: тезисы докладов I Школы молодых ученых – М.: РХТУ им. Д. И. Менделеева. – 2021. – С. 110.

2. Османова, С.Я. Оценка валидационных характеристик методики определения антимикробной активности антибиотиков с применением

светящихся бактерий *Photobacterium leiognathi* Sh1 [Текст] / С.Я. Османова // Теоретические и практические аспекты современной медицины. Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 90-летию со дня основания медицинского вуза в Крыму. – 2021. – С. 188-190.

3. Османова, С.Я. Оценка влияния органических растворителей и рН на биолюминесценцию рекомбинантных штаммов *E. coli* MG1655 [Текст] / С.Я. Османова, Р.А. Кондратьев // Теоретические и практические аспекты современной медицины. Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 90-летию со дня основания медицинского вуза в Крыму. – 2021. – С. 190-192.

4. Османова, С.Я. Сравнительный анализ методов определения антимикробной активности лекарственных препаратов [Текст] / С.Я. Османова, С.Л. Сафронюк, А.М. Кацев // Синтез наук как основа развития медицинских знаний. Сборник материалов II Межвузовской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 50-летию кафедры фармацевтического образования Самарского государственного медицинского университета. – 2021. – С. 79-86.

5. Османова, С.Я. Определение антимикробной активности антибиотиков с применением *Photobacterium leiognathi* Sh1 и *Staphylococcus aureus*: сравнительный анализ [Текст] / С.Я. Османова // Сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной проведению Международного года фундаментальных наук в интересах устойчивого развития «Теоретические и практические аспекты современной медицины». – 2022. – С. 283-284.

6. Османова, С.Я. Биолюминесцентные бактерии как перспективные биотесты для оценки экотоксичности лекарственных препаратов [Текст] / С.Я. Османова, В.В. Самолук // Сборник научных статей и тезисов. V Студенческий конкурс стендовых докладов «Образование и наука: проблемы и перспективы». – 2022. – С. 8-9.

7. Османова, С.Я. Применение биолюминесцентных бактерий для определения антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар / С.Я. Османова, С.Л. Сафронюк, А.М. Кацев // Сборник научных трудов конференции профессорско-преподавательского состава, аспирантов, студентов и молодых ученых им. А.Г. Гурвича. – Симферополь, 2023. – С. 117-119.

8. Османова, С.Я. Исследование антимикробной активности антибиотиков в отношении *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 и природных светящихся бактерий *P. leiognathi* Sh1 / С.Я. Османова, С.Л. Сафронюк, А.М. Кацев // Сборник материалов I всероссийской научно-практической конференции: «Достижения современной науки: биотехнология, химия и фармация». – Симферополь, 2023. – С. 179-180.

Часть исследований выполнена в рамках проекта Фонда содействия инновациям по программе «УМНИК» – «Разработка методик биотестирования веществ органической природы на наличие антимикробной активности с использованием светящихся бактерий» и частично проекта Российского научного фонда № 22-25-20206 – «Разработка скринингового метода оценки антибактериальной активности веществ растительного происхождения и экстрактов лекарственных растений с использованием биосенсоров на основе природных и генно-инженерных штаммов светящихся бактерий».

Структура работы. Исследование описано на 96 страницах машинописного текста. Результаты исследования иллюстрированы 13 таблицами и 2 рисунками. Работа включает в себя введение, обзор литературы, объекты и методы исследования, 2 главы собственных исследований, заключение, список литературы, который состоит из 150 источника, из которых 107 – на иностранном языке.

В главе 1 представлены литературные данные о «традиционных» методах, используемых в научных исследованиях в областях микробиологии и фармации, и новых современных подходах к изучению антибиотиков.

Описаны преимущества и недостатки методик, их технологические особенности и применение в научной деятельности.

Глава 2 содержит описание материалов и методов, используемых в ходе исследования.

В главе 3 представлены результаты изучения антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар с использованием в качестве тест-объектов рекомендованных ГФ тест-объектов, грамотрицательного штамма и биолюминесцентных бактерий.

В главе 4 проведена оценка интенсивности бактериальной биолюминесценции природного тест-штамма под действием антибиотиков и проведена валидация разработанной методики. В главе представлен проект общей фармакопейной статьи «Определение антимикробной активности антибиотиков по измерению изменения интенсивности бактериальной биолюминесценции тест-штамма».

Работа завершается общими выводами по результатам исследования и списком литературы.

ГЛАВА 1. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ АНТИБИОТИКОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1 Микробиологические методы

1.1.1 Лабораторные исследования в клинической микробиологии.

Микробиологические методы оценки чувствительности штаммов являются неотъемлемой частью исследований в области микробиологии и медицины. Они играют важную роль в оценке антибиотиков, так как позволяют определить эффективность лекарственных препаратов (ЛП) в борьбе с различными патогенами [56, 74]. Кроме того, методы позволяют выявить возможные мутации и резистентность микроорганизмов к ЛП данной группы, что также имеет важное значение при выборе оптимального лечения различных заболеваний [18].

Основным свойством антибиотиков является способность к угнетению роста микроорганизмов, таких как бактерии, вирусы и грибки, то есть антимикробная активность [51]. Для определения антимикробной активности, согласно Европейскому комитету по тестированию чувствительности к противомикробным препаратам (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST, Швеция) и рекомендациям Института клинических лабораторных стандартов (Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI, США), предлагаются методы серийных разведений и диффузионные подходы [10, 103, 122].

Сущностью методов серийных разведений является оценка содержания антимикробных веществ [52], определения величины минимальной ингибирующей концентрации (МИК), которая характеризует наименьшее количество антибиотика, частично или полностью подавляющее рост бактерий, грибков или вирусов [103, 122]. Важными показателями являются значения МИК-50 и МИК-90, которые обозначают минимальные

концентрации содержания веществ, при которых рост микроорганизмов ингибируется на 50% и 90% соответственно [41].

Различают два вида метода серийных разведений в бульоне: макрометод (пробирочный), для реализации которого готовят 1 мл каждого разведения антибиотиков с микроорганизмами, и микрометод – объем проб менее 0,2 мл [10]. При проведении серийных разведений в бульоне используется последовательное увеличение концентрации антибиотиков в среде, что позволяет определить МИК [133].

Простота применения, доступность и невысокие материальные затраты на проведение делают методы серийных разведений наиболее популярными подходами для оценки биологической активности антибиотиков. Известно практическое использование методики для обнаружения продукции бета-лактамаз, так как быстрое глобальное распространение бактерий семейства *Enterobacteriaceae* представляет собой значительную клиническую угрозу [84]. Метод серийного разведения позволяет оценить способность изолятов, например, *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*, образовывать биопленки [66], что играет важную роль в лечении биопленочных инфекций. Традиционная пероральная антибиотикотерапия часто не может уничтожить бактерии в форме биопленок [146].

Преимуществом микрометода является возможность тестирования большого количества образцов, экономичность благодаря тестированию проб объемом равным 0,2 мл [93]. Однако, для тестирования необходимо использование 96-луночного планшета для иммунологических исследований, что повышает экспрессность и точность получения результатов [10, 93].

Результаты оценивают по наличию помутнений в питательной среде в сравнении с контрольным образцом, не содержащего антибиотик. Последняя пробирка с разведением, где нет помутнения, т.е. роста культуры, и будет МИК антибиотика [48].

Известен метод серийных разведений в агаре, который имеет схожесть с разведением в жидкой среде, но отличается необходимостью

приготовления двойных серийных разведений антибиотиков от 1:10 000 до 1:320 000 [10] для определения МИК. 1 мл проб каждого разведения содержит по 4 мл (или 9 мл) охлажденного до 45 °С агара [52]. Исследование выполняют путем перенесения антибактериального препарата от меньшей концентрации к большей. После застывания агара пробы засевают исследуемым тест-штаммом и инкубируют в оптимальных условиях.

Основной проблемой в опытах по серийному разведению в агаре является неточность в оценке количества микроорганизмов, что влияет на достоверность полученных результатов [52]. Проведение таких экспериментов требует поддержания постоянных условий, включая использование стандартных питательных сред, сохранение определенной температуры при инкубации и других факторов, делая этот процесс затруднительным. Тем не менее, в сравнении с диффузионными подходами [52, 133], методики являются более точным благодаря возможности применения спектрофотометрических методов для оценки роста бактерий [41].

Диффузионные методы представлены диффузией антибиотика в агар из бумажных дисков, полосок или лунок [15]. Они менее точны, чем серийные разведения, но более просты в исполнении и позволяют определять несколько ЛП одновременно [113]. Методы не позволяют оценивать сложные по составу композиции и различающиеся по молекулярной массе антибиотики [15]. Помимо этого, для некоторых патогенов, таких как грамотрицательные бактерии, может потребоваться проведение дополнительных тестов, поскольку на результаты исследования влияет активность ферментов, разрушающих антибиотики [30, 34]. Это связано с особенностями клеточной стенки и мембраны таких микроорганизмов, которые могут делать их устойчивыми к определенным антибактериальным препаратам [42].

В настоящее время используется модифицированный метод, предложенный Альфредом У. Бауэром и Уильямом М.М. Кирби [75]. Он

отличается использованием дисков из фильтровальной бумаги, пропитанных различными антибиотиками [88]. Для анализа используют стандартные коммерческие диски, содержащие известные концентрации [145]. Они должны храниться строго в соответствии с рекомендациями производителя во избежание ошибок в получении диаметров зон подавления роста связанными со снижением активности антибиотиков [55, 88]. Диаметры зон, полученные в опыте, сравнивают с величинами зон задержки роста, указанными в инструкциях, прилагаемых к дискам. Это ускоряет и повышает точность получения результатов анализа [55].

Метод дисковой диффузии нашел широкое применение в микробиологии для определения чувствительности различных микроорганизмов к антибиотикам и другим химическим веществам. Основным результатом является отнесение микроорганизма к одной из категорий чувствительности: мало- или высокочувствительные, умеренно-чувствительные или резистентные [89, 129]. Чем больше диаметр зоны задержки роста вокруг антибиотика, тем более чувствителен к нему тест-штамм микроорганизма. Отсутствие зоны задержки роста микроорганизмов вокруг диска или диаметр до 10 мм указывает на устойчивость исследуемого тест-штамма культуры к данному антибиотику, от 10 до 15 мм – малая чувствительность к антибиотику, от 15 до 25 мм – умеренная чувствительность, свыше 25 мм – высокая чувствительность [89].

Анализ нашел применение в диагностических лабораториях, позволяя врачам назначать наиболее подходящий антибиотик, благодаря выделению возбудителя инфекции из очага различной локализации и определения чувствительности к антибиотикам [57].

Известно использование данного метода в качестве быстрого и полезного способа тестирования чувствительности пародонтальных патогенов к противомикробным препаратам [46], для определения фенотипа присутствия металло-бета-лактамаз [76], изучения фенотипических и

генотипических характеристик изолятов [44] и других научных исследований.

Стандартизированный метод дисковой диффузии является наиболее распространенной лабораторной процедурой, используемой для определения *in vitro* чувствительности клинических изолятов к противомикробным агентам, так как позволяет получить надежные результаты [71]. Этот метод используется в микробиологии и медицине для тестирования эффективности антибиотиков, антисептиков и других антимикробных средств против различных патогенных микроорганизмов [116].

Таким образом, чувствительность штаммов к антибиотикам играет решающую роль в эффективности лечебной терапии. Результаты микробиологических исследований чувствительности штаммов к антибактериальным ЛП позволяют предотвратить их неправильное использование, что способствует уменьшению развития антибиотикорезистентности и обеспечивает рациональную фармакотерапию [24]. Более того, эти исследования могут помочь в разработке новых антимикробных средств или модификации существующих. Поскольку повышение устойчивости бактерий к антибиотикам – постоянный процесс, с которым сталкивается современная медицина [42].

1.1.2 Микробиологический контроль качества лекарственных препаратов. В настоящее время контроль качества лекарственных субстанций проводят с применением разнообразных подходов: физических, физико-химических, химических и биологических. Однако, антимикробная активность антибиотиков и чувствительность бактерий к этим веществам являются важными аспектами в контроле качества ЛП данной группы [98]. Микробиологические методы позволяют не только проверить эффективность антибиотиков против конкретного микроорганизма, но также установить их минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) [98], что в свою

очередь, оценивает количественное содержание антимикробных агентов в ЛП [51].

Согласно Государственной фармакопее (ГФ) РФ XIV издания антимикробную активность оценивают методом диффузии в агар [3]. Фармакопейная статья дает подробное описание условий и порядка проведения исследования, необходимого оборудования, рабочих концентраций субстанций, режима поддержания и инкубирования микроорганизмов, чувствительных к тому или иному антибиотику [3]. Данный подход основан на сравнении диаметров угнетения роста микроорганизмов, образуемые при внесении в лунки испытуемых растворов антибиотиков [48, 52]. При равных условиях тестирования размеры зон подавления роста обусловлены чувствительностью тест-штамма микроорганизма, содержанием антибиотика в лунке и его способностью к диффузии в толще агара [41].

Основными элементами методики являются тест-штаммы микроорганизмов, чашки Петри с питательной средой для их роста и стандартные образцы антибиотиков [67]. В методе диффузии в агар качество испытуемых веществ устанавливают путем сравнения со стандартными образцами антибиотиков, активность которых подтверждена международными биологическими и химическими стандартами, или качество которых установлено физико-химическими методами [3].

Методика предлагает использование специальных цилиндров, куда помещают испытуемые растворы антибиотиков [10, 114]. Однако, также могут быть использованы лунки диаметром от 6 до 8 мм, сделанные в толще агара с помощью стерильного сверла или другого соответствующего приспособления [48, 92]. Этот способ обеспечивает более равномерное распределение антибиотика в толщу агара и улучшает точность результатов [63, 114].

Преимущества метода диффузии в агар, такие как простота и доступность, возможность количественной оценки ингибирующей

активности веществ, широкий спектр применения и возможность изучения сенсibilidade микроорганизмов к антимикробным препаратам, делают его одним из основных подходов в оценке качества антибиотиков [48]. Для измерения диаметра зоны используется миллиметровая линейка или специальные измерительные устройства, что позволяет легко интерпретировать полученные результаты [81].

Специфичность этого метода заключается в том, что он позволяет определять не только антимикробную активность лекарственных субстанций, но и их лекарственных форм [14, 82]. В первую очередь, это связано с тем, что такой фактор, как посторонние примеси, содержащиеся в испытуемых образцах, в меньшей степени влияют на результат в отличие от физико-химических методов определения [16, 17].

Однако, вместе с его многочисленными достоинствами, метод трудоемок, так как подготовка и поддержание нескольких чашек с агаром и тест-микроорганизмами – сложная и времязатратная процедура [40]. Еще одним недостатком метода диффузии в агаре является зависимость результатов анализа от изменения состава питательной среды и водородного показателя (pH) [25, 89]. Методика менее чувствительна и точна в сравнении с современными лабораторными методами исследования антибиотиков [41, 110].

Метод диффузии в агар рекомендован для количественной оценки содержания некоторых антибиотиков, для которых определение с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) затруднено. Отечественная фармакопея рекомендует данный подход для определения антимикробной активности 45 антибиотиков [3]. Фармакопейные статьи на лекарственные субстанции производных аминогликозидов гентамицина и стрептомицина описывают методики для количественного определения по определению антимикробной активности [2, 4]. Согласно Европейской фармакопее 10.0, методом диффузии в агар количественно оценивают гликопептиды – ванкомицин и

тейкопланин, а также аминогликозиды – стрептомицин, канамицин, гентамицин [6-8].

Наряду с фармакопейным методом, метод дисковой диффузии позволяет проводить качественное определение антибиотиков, так как с помощью данного подхода невозможно определить МИК, минимальную бактерицидную или минимальную бактериостатическую концентрацию, являющейся количественной мерой оценки веществ [108]. Несмотря на то, что методы серийных разведений являются более точными [115], подход нашел применение в качестве качественного скрининга благодаря своей экспрессности и простоте [72, 93].

В настоящее время существует метод градиентной диффузии (эпсилومترический тест, E-тест) [48, 52], который проводят аналогично диско-диффузионному подходу, но с использованием E-теста, представляющий собой полосу с градиентом концентраций антибиотиков [135]. Для тестирования на поверхность агара, предварительно инокулированного тестируемым микроорганизмом, наносится полоска [75]. Несомненным достоинством тестирования является получение точных результатов, позволяющих оценивать количественное содержание, выраженное МИК [62]. E-тест в ряде исследований показал хорошую корреляцию результатов с диско-диффузионным подходом и методами серийных разведений [136, 138].

Метод позволяет исключить необходимость трудоемкого процесса подготовки, характерному стандартным диффузионным подходам, однако не является приоритетным в выборе в связи с высокой стоимостью E-тестов. Хотя в сравнении с методом серийных разведений характеризуется меньшими затратами на анализ, включающий материалы и труд [136].

Таким образом, оценка антимикробной активности является актуальной задачей фармации, в связи с необходимостью разработки новых противомикробных агентов из различных источников для борьбы с возникновением резистентности микроорганизмов [18]. Некоторые

биоанализы, такие как дисковая и луночная диффузия, а также разведение в бульоне или агаре, хорошо известны и широко используются в исследованиях. Эти методы просты в использовании, не требуют специального оборудования и позволяют тестировать несколько объектов одновременно. Однако они имеют свои недостатки, связанные с длительным процессом подготовки и точностью получения и интерпретации результатов [48].

1.2 Билюминесцентный анализ

Билюминесценция – это свечение, возникающее в результате биохимических реакций в живых организмах [13]. Она достаточно широко представлена на разных уровнях организации – у морских позвоночных и беспозвоночных, некоторых грибов, микроорганизмов, наземных членистоногих, таких как светлячки [102]. Среда обитания билюминесцентных бактерий варьируется от морских (например, *Aliivibrio fischeri*) до наземных (например, *Photorhabdus luminescens*).

Методы с использованием билюминесценции бактерий основаны на регистрации изменения интенсивности свечения в результате влияния анализируемого вещества [33, 80]. В основе светоизлучения лежат ферментативные реакции, для протекания которых необходимы восстановленный флаavin-моноклеотид, кислород, длинноцепочечный альдегид и фермент – люцифераза, а конечными продуктами являются жирная кислота, вода и видимый свет [78, 80]. Кроме того, билюминесцентный анализ характеризуется простотой и точностью измерения благодаря использованию современной электронно-оптической техники [106, 132].

Для регистрации билюминесценции используются специальные приборы – люминометры, впервые появившиеся на рынке в 1970-е гг [21]. Люминометры – это устройства, которые используются для измерения

интенсивности света, испускаемого различными источниками, включая бактерии [94]. Использование люминометров позволяет регистрировать интенсивность биолюминесценции и изучать факторы, влияющие на интенсивность биолюминесценции [90]. Благодаря развитию технологий, современные люминометры обладают высокой точностью измерений и широким спектром функций, что делает их незаменимым инструментом для исследования биолюминесценции в современной науке [90, 148].

Люминометры для фиксирования люминесценции оснащены фотоприемником, который регистрирует световой сигнал, испускаемый бактериями [85], преобразуя интенсивность света в цифровой формат [90, 148]. Использование люминометров в исследованиях позволяет быстро и точно определить наличие и интенсивность люминесценции, а также экономит время и усилия исследователей, делая процесс более эффективным [90].

За последние 20 лет известно применение биолюминесцентного анализа в исследованиях загрязнений в окружающей среде, оценки поверхностных пресных, грунтовых и сточных вод [9, 107, 112, 141] и других научных исследованиях [37-39], в том числе *in vivo* [83, 143].

Одним из направлений исследований на основе биолюминесцентных бактерий является поиск усовершенствованных методов, которые, в отличие от традиционных – повсеместно используемых подходов, могли бы позволить заменить длительные и часто трудоемкие процессы. В 2013 году в Германии разработали автоматизированную систему тестирования на долговременную токсичность в отношении люминесцентных бактерий *Vibrio fischeri* [104] путем использования приборов на основе микротитрования.

На основе биолюминесцентных бактерий производят биотесты, которые позволяют определять наличие токсичных веществ в окружающей среде благодаря способности микроорганизмов излучать свет [96, 147]. Благодаря автоматизированным системам и современным приборам, биотесты на основе биолюминесцентных бактерий обеспечивают быструю и

точную оценку экологической обстановки в различных сферах деятельности человека [140]. Их высокая чувствительность к различным загрязнителям делает их незаменимыми инструментами при контроле за качеством воды, почвы и продуктов питания [111].

Биотесты на светящихся бактериях, в сравнении с известными биотестами на основе инфузорий, дафний, водорослей, рыб, являются чувствительными и простыми в использовании [91]. Они позволяют тестировать одновременно большое количество проб и с большой точностью определять количественное содержание токсикантов [120, 139].

На сегодняшний день наиболее распространенными в научных исследованиях, экологическом мониторинге, а также при проведении экспертизы продукции, являются биотесты на основе родов *Photobacterium* и *Aliivibrio* [35]. К *Photobacterium* относят грамтрицательные, оксидазоположительных и каталазоположительных бактерий семейства *Vibrionaceae* [120]. Представителями рода являются светящиеся бактерии *Photobacterium leiognathi*, *Photobacterium phosphoreum* и др [120]. Род бактерий *Aliivibrio* семейства *Vibrionaceae* представлен грамтрицательными прямыми или изогнутыми палочками, которые являются подвижными благодаря одному или нескольким жгутикам [43, 61, 91, 119]. К роду относят биолюминесцентные бактерии *Aliivibrio fischeri*, *Vibrio harveyi* и др.

С помощью таких тестов можно выявить наличие токсичных веществ, таких как тяжелые металлы, пестициды или нефтепродукты, а также оценить их концентрацию [142]. Это позволяет своевременно принимать меры по предотвращению или ликвидации загрязнений и поддерживать экологическую ситуацию на контролируемых территориях.

Наиболее известным биотестом является Microtox, созданный на основе живых лиофилизированных клеток *Aliivibrio fischeri* [86, 87]. Он был разработан в 1979 году для тестирования токсичности воды [59]. Microtox можно применять к различным средам, включая питьевую воду, ливневые стоки, сточные воды, промышленные сбросы, почвы и отложения [109]

Большинство образцов не требуют специальной подготовки перед тестированием, за исключением доведения солености до 2% проб [87], а также осаждения твердых частиц для мутных растворов во избежание поглощения света биолюминесценции [86, 87]. Твердые частицы в образце могут мешать биолюминесценции, приводя к ошибочным результатам анализа. Для этих целей может понадобиться центрифугирование [68] или использование органических растворителей, например, метанола [70].

Помимо этого, на конечные результаты токсичности веществ на *Allivibrio fischeri* может влиять хлор [87]. Для дехлорирования образцов используют раствор тиосульфата натрия и деионизированную воду [49].

Биотесты на основе светящихся бактерий являются инновационным и перспективным инструментом в современных исследованиях [35]. Благодаря постоянному совершенствованию методов и технологий, биотесты на основе биолюминесцентных микроорганизмов остаются актуальным и востребованным инструментом для оценки экологической безопасности и качества окружающей среды [137].

В медицине и фармакологии биотесты на основе светящихся бактерий также являются полезными инструментами [128]. Они могут быть использованы для скрининга новых препаратов, оценки их токсичности или эффективности, а также для исследования действия определенных веществ на живые организмы [130].

Интерпретация результатов аналогично оценивают по ингибированию светоизлучения штаммов под действием токсиканта. Одними из самых распространенных ингибиторов свечения биолюминесцентных бактерий являются промышленные яды, инсектициды, пестициды, отравляющие, лекарственные вещества, такие как анестетики, наркотические вещества и др. [35, 80]. Известны исследования, где биолюминесцентные бактерии используют для оценки токсичности лекарственных препаратов и лекарственного растительного сырья [97, 117]. К основным параметрам, позволяющим оценивать токсичность, относят полумаксимальную

эффективную ($ЭК_{50}$) и пороговую (ПК) концентрации [43]. Эффективная концентрация – это концентрация вещества, которая подавляет интенсивность свечения на 50% в сравнении с контрольной пробой, не содержащей токсикант [119]. Пороговая концентрация – концентрация токсиканта, при которой интенсивность свечения бактерий равна интенсивности свечения в контрольных кюветах [128].

Исследования токсичности веществ позволяют выявить механизмы, например, сульфаниламидов в отношении *Photobacterium phosphoreum* T3 в работах [65, 150]. Учеными доказано, что механизм действия связан со специфическим связыванием мишени, которое может способствовать активации транскрипции, приводящей к усилению активности люциферазы при воздействии низких доз сульфонамидов. По мере увеличения дозы большое количество сульфонамидов конкурентно связывались с дигидроптероатсинтазой, подавляли биосинтез фолиевой кислоты и тем самым вызывали токсичность [65].

Исследования в фармации представлены работами, направленными на оценку неспецифической биологической активности лекарственных препаратов [14, 26, 38]. Полученные результаты определяют механизмы действия лекарственных препаратов, что имеет большое значение для правильного применения, предупреждения нежелательных эффектов и рациональной фармакотерапии в целом [24]. Светящиеся бактерии, ставшие основой для многих методов оценки биологической активности, обеспечивают превосходную чувствительность, экономичность и точность [106, 119, 149].

Благодаря высокой чувствительности светящихся бактерий, такие тесты позволяют сократить время и затраты на исследования, ускоряя процесс разработки новых лекарственных препаратов [43]. Кроме того, использование биотестов на светящихся бактериях в исследованиях позволяет получать результаты в режиме реального времени. Обнаружение и

изменение свечения бактерий происходит практически мгновенно, что значительно сокращает время для анализа и интерпретации результатов [95].

В последнее время эффективным инструментом для оценки токсичности веществ являются биолюминесцентные биотесты на основе рекомбинантных штаммов [95]. Это делает биолюминесцентные биотесты чрезвычайно чувствительными к изменениям в окружающей среде и способными давать быструю и точную информацию о степени токсичности веществ [123]. Биотесты с *lux*-генами позволяют изучать патогенность, вирулентность, адаптацию и вторичный метаболизм бактерий [35].

Использование рекомбинантных штаммов позволяет улучшить чувствительность и специфичность биотестов, а также расширить их спектр применения [23]. Эти штаммы могут быть генетически модифицированы для детекции конкретных веществ или типов токсинов, что делает биотесты еще более информативными и полезными [53, 61].

Таким образом, разнообразие биолюминесцентных биотестов на основе природных и рекомбинантных штаммов открывает широкие возможности для исследований в области экологии, медицины, фармации и других отраслей [50, 53, 96, 121, 132]. Они являются мощным инструментом для оценки воздействия различных веществ на окружающую среду и здоровье человека, а также для поиска новых методов борьбы с загрязнением и патологиями [100].

Измеряя реакции биолюминесценции на различные вещества, биолюминесцентный анализ позволяет оценить степень ингибирования или уничтожения микроорганизмов и точно определить содержание исследуемых соединений [99]. С использованием данного метода возможно обнаруживать даже минимальные количества антибиотиков в образцах, благодаря высокой чувствительности бактерий к веществам различной природы [142]. Еще одним преимуществом является экономическая эффективность: для проведения анализа требуется минимальное оборудование и закупка

небольшого количества расходного материала, что делает его доступным для многих лабораторий и исследовательских центров [132, 149].

Важно отметить, что биолюминесцентный анализ имеет свои ограничения. Для его проведения и интерпретации результатов требуется специальное оборудование и знания, соблюдение определенных условий эксперимента и учета особенностей изучаемых микроорганизмов [121].

Из чего можно заключить, что разработка методики определения качества антибиотиков является актуальной задачей в современной медицине и фармации. Методика позволит обеспечить не только высокую чувствительность, специфичность, точность и повысить экономическую эффективность анализа, но и повлияет на безопасность пациентов, так как подлинность и эффективность ЛП напрямую влияют на успешность лечения.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Предмет и объект исследования

Предметом исследования являлось изучение антимикробной активности, которая количественно выражается в единицах действия (ЕД) или «мкг».

Объектами исследования выступали фармацевтические субстанции (ФС) антибиотиков, полученные от Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). По химической структуре они подразделяются на: производные 6-аминопенициллановой кислоты (6-АПК) – пенициллин G (серия 230310); нафтацена (НЦ) – доксициклина (серия 03211) и тетрациклина (серия 180403-61) гидрохлориды; аминогликозидов (АГ) – гентамицина (серия G1914-250MG) и стрептомицина (серия 170410) сульфаты; 7-аминоцефалоспоровановой кислоты (7-АЦК) – цефазолин (серия C5020-100MG), цефепим (серия 5340621), цефтриаксон (серия C5793-250MG) и цефуроксим (серия 180720); макролиды – 15-членные азалиды (МА) – азитромицин (серия 90323).

Антимикробную активность антибиотиков оценивали в отношении рекомендованных Государственной Фармакопеей тест-микроорганизмов *S. aureus* 209 P и *B. subtilis* ATCC 6633, грамотрицательного штамма *E. coli* ATCC 25922 и люминесцентных бактерий *P. leiognathi* Sh1. Музейные штаммы патогенов входят в коллекцию кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Ордена Трудового Красного Знамени Медицинский институт им. С.И. Георгиевского Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского». Культуры светящихся бактерий, выделенные из Азовского моря [27], из коллекции кафедры медицинской и фармацевтической химии

Института биохимических технологий, экологии и фармации ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского».

2.2 Оборудование

Исследование проведено в Лаборатории биохемилюминесцентных аналитических технологий (Л-БАТ) на базе кафедры медицинской и фармацевтической химии Института биохимических технологий, экологии и фармации ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского». Для проведения исследований было использовано следующее оборудование:

- биохемилюминометр БХЛ-06 (НПО «Биофармаавтоматика», Россия);
- LumiShot (ООО «НПП «Прикладные биосистемы», Россия);
- электронные весы OHAUS Scout (OHAUS, США);
- дозаторы механические переменного объема одноканальный FAV 0,5-10,0; 2,0 -20,0 мкл; 20-200 мкл, 100-1000 мкл (Ассимах, Индия);
- орбитальный настольный шейкер OS- 20 для перемешивания жидкостей (Biosan, Латвия);
- термостат электрический с охлаждением ТСО-1/80 СПУ (АО «Смоленское СКТБ СПУ», Россия);
- вортекс V-1 plus (BioSan, Латвия);
- бокс абактериальный воздушный среды БАВ-ПЦР-«Ламинар-С» (LAMSYSTEMS, Россия);
- система гель-документирования «Взгляд» (Компания Хеликон, Россия).

2.3 Методы исследования

2.3.1 Определение антимикробной активности методом диффузии в агар. Метод диффузии в агар, как и большинство микробиологических методов, включает подготовку питательных сред, культивирование и идентификацию микроорганизмов [48].

Питательные среды готовили из Nutrient agar M001-500G (HiMedia, Индия, lot: 0000387742), которые представляют собой высушенные и измельченные до порошкообразного состояния готовые питательные среды. В работе рекомендуется использовать сухие питательные среды, преимуществами которых является простота изготовления готовых для тестирования сред, а также стандартность состава и условий производства, необходимых для определения антимикробной активности [31]. В питательные среды, используемые для культивирования патогенных микроорганизмов, добавляли натрия хлорид в количестве 0,9% соответственно от общего объема [3]. Оптимальным содержанием соли для роста *P. leiognathi* Sh1 является 3% [27]. Готовый светло-янтарный прозрачный раствор стерилизовали кипячением 2-3 дня или автоклавированием при 1,1 атм в течение 15 минут. Полученную питательную среду разливали по чашкам Петри или использовали для определения антимикробной активности методом диффузии в агар.

В качестве бульона использовали порошок Nutrient Broth M002-500G (HiMedia, Индия, lot: 0000387742). В среду, аналогично агару, добавляли необходимое количество натрия хлорида и стерилизовали. Готовый бульон разливали в стерильном боксе во флаконы по 5 миллилитр (мл) [32].

Посев микроорганизмов в бульон осуществляли стандартным микробиологическим методом с использованием бактериологической петли [29]. Культивировали бактерии в термостатах, в подходящих для микроорганизмов условиях, при температуре 37 °С для *S. aureus* 209 P, *B.*

subtilis ATCC 6633, *E. coli* ATCC 25922 до 24 часов [3, 10] и 25 °С– для *P. leiognathi* Sh1 до 16-18 часов [28].

По окончании инкубации наличие роста микроорганизмов определяли визуально по помутнению жидкой питательной среды в проходящем свете или по образованию осадка оседающих бактерий. Для биолюминесцентных тест-штаммов показателем служило наличие видимого в темноте свечения в сине-зеленой области света [11], возникающего за счет протекающей ферментативной реакции, катализируемой люциферазой [21]. Одной из важнейших характеристик при их идентификации природного люминесцентного штамма *P. leiognathi* Sh1 являются значения оптической плотности (0,61) и удельного свечения ($8,09 \cdot 10^{-5}$ мВ/кл) [11].

Чашки Петри с выращенными микроорганизмами герметично обматывали пленкой Парафильм М (50 мм x 75 мм, PCGroup) и хранили в холодильнике при температуре 5-8 градусов по Цельсию, не замораживая [19]. «Обновление» культур на чашки производили каждые 2 недели и специальных «музеев» для длительного хранения раз в 1 год.

Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар проводили согласно ОФС «Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар» [3]. Диффузионный метод включал несколько этапов: подготовка питательных сред (ПС), приготовление суспензии исследуемых микроорганизмов, внесение испытуемых антибиотиков, инкубация, регистрация и интерпретация результатов [10].

В расплавленный агар, охлажденный до 49 ± 1 °С, добавляли бактериальную суспензию (БС) тестируемого тест-штамма. Она представляла собой выращенные в жидкой питательной среды микроорганизмы в течении суток. Количество посевной дозы для *S. aureus* 209 P, согласно ГФ РФ XIV издания, составило 40 млн микробных клеток на 1 мл среды [3]. Количество бактерий *B. subtilis* ATCC 6633 для производных 7-АЦК насчитывало 100 млн спор на 1 мл среды, что соответствует определению антимикробной

активности цефалексина, представителя группы, указанного в Фармакопее [3]. Для производных других групп использовали 20 млн спор на 1 мл среды. ПС с микроорганизмами разливали в стерильные чашки Петри объемом 2/3 и после застывания образовывали 6 одинаковых лунок на одинаковом расстоянии друг от друга и от края чашки [3].

Для приготовления испытуемых растворов отвешивали 10 миллиграмм (мг) ФС антибиотика и растворяли в соответствующем растворителе объемом 1000 микролитров (мкл). Для патогенных тест-штаммов *S. aureus* 209 P, *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 25922 растворителем служил 0,9% раствор натрия хлорида, для *P. leiognathi* Sh1 – 3% [27]. Эппендорф с полученным раствором, концентрация которого 10 000 мкг/мл, перемешивали с использованием вортекса в течении 30 секунд. Таким образом, был получен основной раствор, из которого готовили испытуемые. Для этого, в эппендорф с растворителем вносили объемы основного раствора так, чтобы концентрации были равны испытуемым. Согласно ГФ РФ XIV издания, контрольные концентрации антибиотиков находились в диапазоне от 1 до 10 мкг/мл. Для антибиотиков, не содержащихся в перечне антибактериальных веществ в фармакопейной статье, также использовался данный диапазон. При отсутствии влияния на рост в концентрациях 1-10 мкг/мл, использовался диапазон от 50 до 200 мкг/мл.

Полученные испытуемые растворы ФС антибиотиков вносили в лунки чашек агара и инкубировали в необходимых для тест-объектов условиях. Антимикробную активность антибиотиков определяли путем измерения диаметров зон подавления роста тест-штамма микроорганизмов с точностью до 0,1 мм [3]. Согласно фармакопейной методике, исследование было проведено в 6 повторах в разные дни (не менее 2 дней) в связи с вариабельностью данных, получаемых в результате микробиологических испытаний [3]. Данные фиксировали в файл Excel.

2.3.2 Определение антимикробной активности антибиотиков по измерению изменения интенсивности бактериальной биолюминесценции. На первом этапе приготовления испытуемых растворов отвешивали 10 мг ФС антибиотиков и растворяли в 3% растворе натрия хлорида. Эппендорф с полученным раствором энергично встряхивали вручную или с использованием вортекса в течении 30 секунд. Таким образом, из полученного раствора с концентрацией 10 000 мкг/мл (основной раствор) готовили испытуемые. Приготовленные растворы антибиотиков вносили в кюветы люминометра в объеме, чтобы конечная концентрацией в пробе равными испытуемым. Далее в растворы вносили разбавленную 1:50 ночную культуру тест-штамма микроорганизмов в объеме 50 мкл. Общий объем пробы в кювете составил 1000 мкл. В качестве контрольного образца светимости тест-штамма выступала система, содержащая БС и раствор натрия хлорида.

Интенсивность свечения *P. leiognathi* Sh1 оценивали с помощью устройств, фиксирующих бактериальную биолюминесценцию тест-штаммов – биохемилюминометра БХЛ-06 (НПО «Биофармаавтоматика», Россия) и LumiShot (ООО «НПП «Прикладные биосистемы», Россия). Перед внесением кювет в прибор растворы перемешивали с помощью вортекса. Измерения выполняли не менее чем в 3 повторах. Активность ФС характеризовали с помощью индекса биолюминесценции, который рассчитывают по формуле: $БЛИ = I_i/I_0 \times 100\%$, где где I_i – интенсивность люминесценции бактерий в контроле, I_0 – интенсивность свечения бактерий в опытной пробе [21]. Данные вносили в файл Excel.

2.3.3 Статистическая обработка данных. Обработку результатов осуществляли с помощью программы Microsoft Excel. Метрологические характеристики результатов, получаемых при получении данных эксперимента, будем оценивать согласно ОФС.1.1.0014.15 «Статистическая

обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами» [5].

Для статистической обработки результатов рассчитывали среднее значение \bar{x} с полушириной доверительного интервала Δx при доверительной вероятности 99 %. Меру взаимосвязи между сравниваемыми методиками показывали с помощью коэффициента корреляции Карла Пирсона. При проведении статистических анализов, установлены следующие значения границ статистической значимости: для критериев Стьюдента – 0,05, а для расчета F-критерия в оценке различий дисперсий – 0,01.

Валидацию аналитической методики осуществляли на основании согласно Государственной фармакопее XV ОФС.1.1.0012.15 Валидация аналитических методик по параметрам: предел обнаружения, предел количественного определения, аналитическая область, линейность, правильность и промежуточную (внутрилабораторную) прецизионность.

ГЛАВА 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ АНТИБИОТИКОВ МЕТОДОМ ДИФФУЗИИ В АГАР

3.1 Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар с использованием в качестве тест-объектов *S. aureus* 209 P

Определение антимикробной активности антибиотиков, согласно ГФ РФ XIV издания, проводят методом диффузии в агар [3]. В качестве тест-микрорганомов используются 9 штаммов, которые являются представителями видов *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Bordetella bronchiseptica*, *Candida utilis* [3]. *Staphylococcus aureus* 209 P представляет собой факультативный анаэроб, мезофильный, грамположительный человеческий патоген, обладающий множественной устойчивостью к антибиотикам [12].

Тест-штамм является одним из наиболее часто выбираемых для тестирования антибиотиков микроорганизмов, благодаря легкости культивирования на питательных средах и быстрой репродукции [131]. *S. aureus* широко распространен и способен вызывать множество различных инфекционных заболеваний, включая пневмонию, сепсис и инфекции кожи [118], а также внебольничные инвазивные инфекции и стафилококковые пищевые токсикоинфекции [118].

Согласно рекомендациям, штамм применяется для оценки антимикробной активности ампициллина, бензилпенициллина, диклоксациллина, метициллина, нетилмицина, оксациллина и феноксиметилпенициллина, контрольные концентрации которых, для проведения контроля качества, находятся в диапазоне от 1 до 10 мкг/мл [3]. В связи с чем, антибиотики были исследованы в данном диапазоне.

Выбор антибиотиков основывался на чувствительности штамма к препаратам, с учетом последних научных исследований и клинических рекомендаций [73]. Перечень исследуемых веществ отличается от

фармакопейного, так как он обновляется в рекомендациях по лечению распространенных инфекций [125], возбудителем которых является *S. aureus*.

Результаты ингибирования роста бактерий под действием влияния 10 антибиотиков в отношении штамма *S. aureus* 209 P в диапазоне концентраций от 1 до 10 мкг/мл выражали в виде среднего арифметического с доверительным интервалом $\bar{x} \pm \Delta x$ в таблице 1.

Таблица 1 – Средние значения диаметров (d, мм) зон задержки роста *S. aureus* 209 P в диапазоне концентраций 1-10 мкг/мл

Антибиотик	С, мкг/мл					
	0	1	2	4	5	10
Азитромицин	0	13,7 ± 0,2	15,4 ± 0,2	17,2 ± 0,3	18,0 ± 0,2	20,5 ± 0,2
Гентамицин	0	12,0 ± 0,2	14,8 ± 0,1	16,8 ± 0,1	22,8 ± 0,2	25,1 ± 0,2
Доксициклин	0	15,9 ± 0,1	16,3 ± 0,2	19,4 ± 0,2	20,0 ± 0,2	24,8 ± 0,1
Стрептомицин	0	1,5 ± 1,2	3,0 ± 0,7	4,5 ± 0,4	4,8 ± 1,4	7,8 ± 0,3
Тетрациклин	0	9,2 ± 0,1	12,0 ± 0,2	13,8 ± 0,1	18,4 ± 0,2	20,2 ± 0,2
Цефазолин	0	1,0 ± 0,1	2,8 ± 0,1	4,8 ± 0,1	8,0 ± 0,2	10,2 ± 0,2
Цефепим	0	5,4 ± 0,1	6,0 ± 0,2	6,9 ± 0,1	8,7 ± 0,1	12,7 ± 0,1
Цефтриаксон	0	6,3 ± 0,1	14,1 ± 0,1	16,8 ± 0,2	19,2 ± 0,1	21,2 ± 0,1
Цефуросксим	0	0,6 ± 0,2	1,3 ± 0,1	3,2 ± 0,3	8,0 ± 0,2	10,4 ± 0,2

Полученные результаты во всем изученном диапазоне концентраций отличались от других антибиотиков для азитромицина, гентамицина, доксициклина и тетрациклина. *S. aureus* 209 P оказался наиболее чувствительным к действию данных ФС, что связано с широким спектром действия на бактерии [118]. Из производных 7-АЦК цефепим и цефтриаксон характеризовались большими диаметрами зон задержки роста, чем цефазолин и цефуросксим, что согласуется с литературными данными и связано со спектром антимикробного действия антибиотиков в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий [45].

Для обнаружения зависимости между d и концентрациями пенициллина G, антибиотик протестирован в диапазоне концентраций 50-200 мкг/мл. Было выявлено, что исследуемый антимикробный агент ингибировал рост бактерий *S. aureus* 209 P при 50 мкг/мл содержания в лунке с d равным $2,6 \pm 0,2$ мм, при 200 мкг/мл – $16 \pm 0,3$ мм. Что соотносится с имеющимися литературными данными и связано с распадом антибиотика в водных растворах [101].

В ходе проведенных исследований взаимосвязь концентраций антибиотиков и их влияния на рост тест-микроорганизмов *S. aureus* 209 P характеризовали полулогарифмической моделью, где значения d логарифмировали по натуральному основанию, для получения линейной зависимости. Все антибиотики показали линейную прямую (таблица 2) с высокой точностью, выраженной коэффициентами достоверности аппроксимации (R^2). Модели зависимостей характеризовались R^2 равными от 0,789 до 0,978.

Таблица 2 – Математические выражения зависимостей диаметров зон задержки роста *S. aureus* 209 P от концентраций антибиотиков

Наименование антибиотика	Уравнение линейной зависимости	R^2
Азитромицин	$y = 0,0416x + 2,6382$	0,907
Гентамицин	$y = 0,0789x + 2,5231$	0,823
Доксициклин	$y = 0,0506x + 2,7234$	0,973
Пенициллин G	$y = 0,0107x + 0,7597$	0,839
Стрептомицин	$y = 0,1595x + 0,6155$	0,831
Тетрациклин	$y = 0,0817x + 2,2898$	0,804
Цефазолин	$y = 0,1498x + 0,9637$	0,789
Цефепим	$y = 0,096x + 1,6004$	0,978
Цефтриаксон	$y = 0,0472x + 2,6212$	0,829
Цефуроксим	$y = 0,305x - 0,2746$	0,789

В ходе проведенных исследований с использованием *S. aureus* 209 P для всех антибиотиков получили данные ингибирования роста сопоставимые с литературными данными. По результатам диаметров зон были построены калибровочные кривые, отражающие зависимость роста *S. aureus* 209 P от концентрации антибиотиков. Эти данные полезны для дальнейшего анализа и сопоставления результатов воздействия антибиотиков на рост других бактерий.

Экспериментальные данные с использованием патогенных микроорганизмов выявили большой разброс значений повторов, что способствует получению ложноположительных и ложноотрицательных результатов, что, в свою очередь, негативно сказывается на достоверности данных.

Недостатком способа определения антимикробной активности с использованием патогенных микроорганизмов является возможность развития резистентности к антибиотикам в процессе проведения эксперимента [20]. Длительное воздействие антимикробных агентов на штаммы может способствовать мутациям, в результате чего микроорганизмы становятся устойчивыми [45]. Это может существенно исказить результаты и не позволит получить достоверные данные о качестве антибиотиков.

Помимо этого, штаммы могут проявлять различную реакцию на разные группы антибиотиков, обладая неодинаковой чувствительностью. Поэтому, данные, полученные с использованием патогенных микроорганизмов, могут быть не полностью достоверными для оценки реального количественного содержания [98].

3.2 Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар с использованием в качестве тест-объектов *B. subtilis* ATCC 6633

В ГФ РФ XIV издания, помимо *S. aureus* 209 P, представителями грамположительных бактерий являются бактерии рода *Bacillus* [3]. *Bacillus*

cereus, *Bacillus pumilus* и *Bacillus subtilis* – это грамположительные, подвижные, спорообразующие, палочковидные бактерии, способные жить как с кислородом, так и без него [47, 58]. Помимо этого, микроорганизмы имеют схожие фенотипические и генетические признаки [79].

Штамм *B. subtilis* ATCC 6633 широко используется в научных и промышленных исследованиях благодаря своим полезным свойствам, таким как способность к продуцированию различных ферментов, антибиотиков и других биологически активных веществ, а также часто применяется в биотехнологии и производстве пищевых добавок [134].

Фармакопейная статья рекомендует данный тест-объект для оценки амикацина, блеомицетина, ванкомицина, гелиомицина, канамицина В, капреомицина, линкомицина, оливомицина, рифампицина, флоримицина, цефалексина и цефалотина [3]. Для большинства антибиотиков контрольные концентрации, аналогично *S. aureus* 209 P, находились в диапазоне 1-10 мкг/мл. Для ванкомицина, капреомицина, линкомицина эта концентрация составила 100 мкг/мл. Поскольку испытуемые антибиотики по химическому составу сходны с антибиотиками, контрольные концентрации которых находятся в диапазоне от 1 до 10 мкг/мл, бактерии инкубировали с антибиотиками аналогичных концентраций.

В отношении штамма *B. subtilis* ATCC 6633 гентамицин, стрептомицин, тетрациклин, цефазолин, цефепим, цефтриаксон и цефуроксим оказывали влияние при C_{min} равной 1 мкг/мл. Азитромицин и доксициклин оказывали влияние на рост при 2 мкг/мл с d равными 1,2 и 5,7 мм. Цефепим и цефтриаксон оказывали меньшее антимикробное действие в отношении штамма. Для цефепима и цефтриаксона d зон, равные 1,9 и 2,4 мм, были выявлены только при 10 мкг/мл. Результаты представлены в таблице 3. Из 10 субстанций антибиотиков, исследованных в диапазоне от 1 до 10 мкг/мл, пенициллин G, цефепим, цефтриаксон и цефуроксим оказывали слабое влияние на рост или не проявляли активность при инкубации с *B. subtilis* ATCC 6633.

Таблица 3 – Средние значения диаметров (d, мм) зон задержки роста *B. subtilis* ATCC 6633 в диапазоне концентраций 1-10 мкг/мл

Антибиотик	С, мкг/мл					
	0	1	2	4	5	10
Азитромицин	0	0	1,2 ± 1,1	3,9 ± 0,7	4,2 ± 0,9	6,4 ± 0,9
Гентамицин	0	4,3 ± 0,4	5,4 ± 0,7	6,2 ± 0,7	8,4 ± 1,1	10,3 ± 0,5
Доксициклин	0	0	5,7 ± 0,9	7,7 ± 0,2	8,6 ± 0,5	9,4 ± 0,99
Пенициллин G		0	0	0	0	0
Стрептомицин	0	2,4 ± 1,2	3,1 ± 0,8	7,7 ± 0,6	8,6 ± 0,6	10,3 ± 0,9
Тетрациклин	0	5,3 ± 0,7	6,4 ± 0,4	7,0 ± 0,7	7,8 ± 0,5	9,3 ± 0,8
Цефазолин	0	3,3 ± 1,0	3,9 ± 0,7	4,5 ± 0,3	5,3 ± 1,1	6,9 ± 0,6
Цефепим	0	0	0	0	0	1,9 ± 1,6
Цефтриаксон	0	0	0	0	0	2,4 ± 2,0
Цефуроксим	0	0	0	0	0	0

Перечисленные антибиотики, на втором этапе, согласно литературным данным, инкубировали в более высоких концентрациях от 50 до 200 мкг/мл (таблица 4).

Таблица 4 – Средние значения диаметров (d, мм) зон задержки роста *B. subtilis* ATCC 6633 в диапазоне концентраций 50-200 мкг/мл

Антибиотик	С, мкг/мл					
	0	50	100	150	150	200
Пенициллин G	0	2,5 ± 0,4	4,3 ± 0,9	5,0 ± 0,7	6,9 ± 0,6	7,7 ± 0,7
Цефепим	0	3,0 ± 1,9	4,6 ± 0,7	6,4 ± 0,6	8,3 ± 0,6	9,0 ± 1,2
Цефтриаксон	0	6,0 ± 1,4	7,7 ± 1,0	8,6 ± 0,9	9,4 ± 0,8	10,3 ± 1,2
Цефуроксим	0	5,0 ± 0,5	6,3 ± 1,1	9,0 ± 0,5	11,7 ± 0,8	14,3 ± 0,4

Пенициллин G, цефепим, цефтриаксон и цефуроксим оказывали влияние на рост при 50 мкг/мл. Результаты исследования показали, что азитромицин, гентамицин, доксициклин, тетрациклин, цефепим, цефтриаксон

и цефуроксим обладали большей чувствительностью к *S. aureus* 209 P. При этом сходимость результатов, выраженная коэффициентом корреляции Пирсона (r-Пирсона), показала значения равные 0,871; 0,962; 0,909; 0,971; 0,965; 0,834 и 0,907 для азитромицина, гентамицина, доксициклина, тетрациклина, цефепима, цефтриаксона и цефуроксима. Стрептомицин и цефазолин обладали антибактериальной активностью как к *S. aureus* 209 P, так и к *B. subtilis* ATCC 6633 со схожимостью 0,942 и 0,954.

В ходе проведенных исследований все антибиотики показали линейную взаимосвязь по их содержанию в лунке и влиянию на рост тест-микроорганизмов, логарифмированные по натуральному основанию, с R² равными от 0,790 до 0,972 (таблица 5).

Таблица 5 – Математические выражения зависимостей диаметров зон задержки роста *B. subtilis* ATCC 6633 от концентраций антибиотиков

Наименование антибиотика	Уравнение линейной зависимости	R ²
Азитромицин	$y = 0,2088x + 0,0481$	0,790
Гентамицин	$y = 0,0935x + 1,4746$	0,889
Доксициклин	$y = 0,0075x + 2,0937$	0,868
Пенициллин G	$y = 0,0068x + 0,8058$	0,855
Стрептомицин	$y = 0,3462x + 0,5112$	0,972
Тетрациклин	$y = 0,0573x + 1,6989$	0,907
Цефазолин	$y = 0,0791x + 1,1838$	0,954
Цефепим	$y = 0,0084x + 0,7566$	0,893
Цефтриаксон	$y = 0,0032x + 1,7446$	0,848
Цефуроксим	$y = 0,007x + 1,3523$	0,943

Помимо недостатков, описанных в Главе 3.1, полученные результаты выявили, что бактерии *B. subtilis* ATCC 6633 показали меньшую чувствительность к большинству антибиотиков. В связи с чем, антибиотики не всегда могут быть обнаружены стандартным методом тестирования с использованием патогенных грамположительных бактерий.

3.3 Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар с использованием в качестве тест-объектов грамотрицательных бактерий *E. coli* ATCC 25922

Среди представленных микроорганизмов в ГФ РФ XIV издания лишь *Pseudomonas aeruginosa* является грамотрицательной бактерией, однако она характеризуется высокой устойчивостью к действию многих антибиотиков [22, 42, 77] и применяется только для контроля качества карбенициллина [3].

В свою очередь, в современных исследованиях применяют разнообразные модельные микроорганизмы. Среди всего многообразия бактерий широкое применение нашли представители видов *Bacillus subtilis*, *Mycoplasma genitalium*, *Salmonella typhimurium* и *Escherichia coli* [58, 124, 144]. Для определения антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар были выбраны бактерии *E. coli*, поскольку к данному виду грамотрицательных микроорганизмов, наряду с *S. typhimurium*, относят большое количество штаммов, которые безвредны для человека и являются частью нормальной микрофлоры кишечника [60]. Штаммы *E. coli* давно используются как модельные микроорганизмы в микробиологических, молекулярно-генетических, биотехнологических и других исследованиях благодаря своей низкой вирулентности, третьей группы патогенности, простоте работы и умеренной генетической пластичности [144].

В свою очередь, причиной, как внебольничных, так и госпитальных заболеваний разной локализации, в том числе мочевыводящих путей и респираторного тракта, являются представители семейства *Enterobacteriaceae* [34, 36, 126], штаммы которых уже более 80 лет служат объектом для опытов в различных областях науки. Однако применимость *E. coli*, а в частности стандартизованного штамма ATCC 25922, еще не показана для проведения контроля качества антибактериальных субстанций и ЛП на их основе.

Кроме того, для разработки методики определения антимикробной активности по измерению изменения интенсивности люминесценции

планируется использовать тест-штамм *P. leiognathi* Sh1, который является грамотрицательным [11].

В результате исследования 10 антибиотиков различных химических структур методом диффузии в агар в отношении *E. coli* ATCC 25922 для всех исследуемых ФС были выявлены зоны задержки роста. C_{min} для азитромицина, гентамицина, доксициклина, стрептомицина, тетрациклина, цефепима, цефтриаксона составила 1 мкг/мл. Данные представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Средние значения диаметров (d, мм) зон задержки роста *E. coli* ATCC 25922 в диапазоне концентраций 1-10 мкг/мл

А/б	С, мкг/мл					
	0	1	2	4	5	10
1	0	12,0 ± 0,3	15,0 ± 0,3	16,5 ± 0,2	16,9 ± 0,1	19,5 ± 0,2
2	0	1,2 ± 0,2	3,6 ± 0,2	6,0 ± 0,1	7,2 ± 0,1	8,4 ± 0,2
3	0	2,6 ± 0,1	4,3 ± 0,1	6,0 ± 0,2	6,8 ± 0,2	8,6 ± 0,2
4	0	0	0,8 ± 0,5	2,7 ± 0,2	3,0 ± 0,1	4,5 ± 0,2
5	0	0,9 ± 0,5	3,4 ± 0,2	6,0 ± 0,2	7,7 ± 0,3	10,3 ± 0,2
6	0	1,8 ± 0,2	2,8 ± 0,2	4,6 ± 0,1	5,5 ± 0,3	6,5 ± 0,1
7	0	0	0	0	0	0
8	0	7,4 ± 0,1	9,4 ± 0,1	12,6 ± 0,1	15,4 ± 0,1	22,6 ± 0,2
9	0	14,0 ± 0,1	15,5 ± 0,1	17,5 ± 0,1	18,8 ± 0,2	21,6 ± 0,2
10	0	0	0	0	0	0

Примечание: 1 – азитромицин, 2 – гентамицин, 3 – доксициклин, 4 – пенициллин G, 5 – стрептомицин, 6 – тетрациклин, 7 – цефазолин, 8 – цефепим, 9 – цефтриаксон, 10 – цефуроксим.

Пенициллин G оказывал влияние при 2 мкг/мл с $d = 0,8$ мм и характеризовался увеличением зоны до 10,5 мм при 200 мкг/мл содержания в пробе (таблица 7). Цефазолин и цефуроксим при 50 мкг/мл вызывали $d = 4,3$ и 5,5 мм, а при $C_{max} = 200$ мкг/мл – 10,3 и 18,5 мм соответственно.

Таблица 7 – Средние значения диаметров (d, мм) зон задержки роста *E. coli* ATCC 25922 в диапазоне концентраций 50-200 мкг/мл

A/б	C, мкг/мл					
	0	50	75	100	150	200
1	0	20,6 ± 0,5	22,0 ± 0,6	25,0 ± 0,5	26,5 ± 0,5	26,9 ± 0,9
2	0	15,4 ± 0,6	18,9 ± 0,4	20,6 ± 0,7	21,4 ± 0,2	24,0 ± 0,1
3	0	10,5 ± 0,4	12,0 ± 0,3	12,9 ± 0,8	14,3 ± 1,1	15,4 ± 0,7
4	0	7,7 ± 0,5	8,5 ± 0,5	9,1 ± 0,6	9,9 ± 0,3	10,5 ± 1,0
5	0	12,9 ± 0,3	13,4 ± 0,2	16,0 ± 1,0	17,7 ± 0,4	20,3 ± 0,7
6	0	11,8 ± 0,4	12,4 ± 0,3	13,9 ± 0,5	15,4 ± 0,9	16,3 ± 0,6
7	0	4,3 ± 0,2	6,0 ± 0,1	7,7 ± 0,1	8,6 ± 0,2	10,3 ± 0,1
8	0	24,3 ± 0,8	26,0 ± 0,7	27,1 ± 0,5	27,7 ± 0,6	29,7 ± 0,9
9	0	24,0 ± 0,5	25,7 ± 0,8	29,1 ± 0,7	30,9 ± 0,6	32,4 ± 0,6
10	0	5,5 ± 0,1	6,4 ± 0,2	8,3 ± 0,2	11,1 ± 0,2	18,5 ± 0,2

Примечание: 1 – азитромицин, 2 – гентамицин, 3 – доксициклин, 4 – пенициллин G, 5 – стрептомицин, 6 – тетрациклин, 7 – цефазолин, 8 – цефепим, 9 – цефтриаксон, 10 – цефуроксим.

В результате сравнения с данными, полученными в отношении рекомендованного ГФ РФ XIV издания тест-штамма *S. aureus* 209 P, было выявлено, что цефепим и цефтриаксон активны по отношению к обоим тест-объектам, однако *E. coli* ATCC 25922 оказалась более чувствительна. Большая активность цефепима и цефтриаксона в отношении грамотрицательных бактерий, среди других производных 7-АЦК, связана с широким спектром действия как на грамположительные, так и на грамотрицательные бактерии. Особой характеристикой цефепима является устойчивость к ферменту цефалоспоринолазе, присутствующем среди представителей семейства *Enterobacteriaceae* [34].

Для сравнения результатов, полученных в отношении *S. aureus* 209 P и *E. coli* ATCC 25922, рассчитали r-Пирсона. Для цефепима и цефтриаксона они составили 0,940 и 0,965 соответственно. Азитромицин и стрептомицин

активны в отношении обоих штаммов с высокой корреляцией данных – 0,994 и 0,973. Гентамицин, доксициклин и тетрациклин создавали меньшие в диаметре зоны задержки роста при инкубации с *E. coli* ATCC 25922, чем *S. aureus* 209 P. Однако, корреляционный анализ с применением с r-Пирсона выявил высокую степень сходимости результатов равные 0,907; 0,931 и 0,914 соответственно.

Цефазолин и цефуроксим, с преимущественным действием в отношении грамположительных бактерий, характеризовались зонами задержки роста в диапазоне 1-10 мкг/мл только для *S. aureus* 209 P. Сравнение d двух тест-штаммов под действием цефазолина и цефуроксима показали высокую степень сходимости данных и выражались коэффициентами 0,948 и 0,883.

При сравнении влияния пенициллина G на *E. coli* ATCC 25922 и *S. aureus* 209 P данные показали высокую степень сходимости с r-Пирсона равным 0,855. Слабая активность антибиотика в отношении штамма *E. coli* ATCC 25922 может быть связана с ферментативным гидролизом β -лактамного кольца производных 6-АПК, который происходит благодаря выработке пенициллинацилазы [30].

В результате сравнения влияния ФС на тест-штаммы *B. subtilis* ATCC 6633 и *E. coli* ATCC 25922 было выявлено, что азитромицин, доксициклин, пенициллин G, цефепим, цефтриаксон и цефуроксим проявляли большую активность в отношении альтернативного тест-микроорганизма. Сходимость для перечисленных антибиотиков была выражена в r-Пирсона равными 0,855; 0,975; 0,915; 0,846; 0,844 и 0,982.

B. subtilis ATCC 6633 и *E. coli* ATCC 25922 показали чувствительность к действию гентамицина, стрептомицина и тетрациклина с коэффициентами 0,984; 0,978 и 0,970, так как антибиотики характеризуются широким спектром действия [69]. Цефазолин создавал меньшие в диаметре зоны задержки роста при инкубации с *E. coli* ATCC 25922, чем с *B. subtilis* ATCC

6633. Однако, корреляционный анализ с применением с r-Пирсона выявил высокую степень сходимости результатов равным 0,919.

Пригодность методики определения антимикробной активности с использованием *E. coli* ATCC 25922 доказывали на основании оценки валидационных характеристик. Согласно ГФ, методики количественного определения основных действующих веществ подвергают валидации по характеристикам: линейность, правильность, аналитическая область и внутрилабораторная прецизионность [5].

Для всех антибиотиков экспериментально установили зависимости по их влиянию на тест-микроорганизмы *E. coli* ATCC 25922, которые характеризовались увеличением зоны задержки роста бактерий при увеличении их концентраций в пробе при объеме выборки $n = 6$.

Линейность методики подтверждена анализом 6 проб разных концентраций содержания антибиотика: в диапазоне от 1 до 10 мкг/мл – для азитромицина, гентамицина, доксициклина, стрептомицина, тетрациклина, цефепима и цефтриаксона, от 50 до 200 мкг/мл – для пенициллина G, цефазолина и цефуросима. Наибольшие значения R^2 (0,927-0,990) были характерны для пенициллина G, тетрациклина, цефепима, цефтриаксона и цефуросима. Модели линейных зависимостей остальных испытуемых антибиотиков характеризовались R^2 равными 0,805-0,876.

Математическое выражение для линейной зависимости между концентрацией в пробе антибиотика и зонами задержки роста *E. coli* ATCC 25922 было выражено в виде уравнения (таблица 8).

Линейные уравнения зависимости d от концентраций позволяют определять количественное содержание антибиотика в пробе по величине отклика аналитического сигнала (d , мм), являющегося «х», в диапазоне аналитической области.

Внутрилабораторная прецизионность определялась путем проведения анализа одних диапазонов концентраций в разное время, дни в 6 повторных испытаниях для тест-штамма.

Таблица 8 – Основные валидационные характеристики результатов эксперимента с использованием в качестве тест-объекта *E. coli* ATCC 25922

Наименование антибиотика	Уравнение линейной зависимости	R ²	АО, мкг/мл	ВЛП, %
Азитромицин	$y = 0,046x + 2,5566$	0,805	16,98-51,46	99,9
Гентамицин	$y = 0,0148x + 1,7466$	0,830	3,66-11,09	99,9
Доксициклин	$y = 0,0795x + 1,4126$	0,876	5,14-15,58	99,8
Пенициллин G	$y = 0,002x + 1,9791$	0,945	7,94-24,08	98,9
Стрептомицин	$y = 0,1252x + 1,19$	0,820	6,37-19,31	99,5
Тетрациклин	$y = 0,0022x + 2,3722$	0,953	5,34-16,17	99,7
Цефазолин	$y = 0,0053x + 1,3488$	0,873	106,93-324,03	99,9
Цефепим	$y = 0,12x + 1,9976$	0,944	4,04-12,25	99,9
Цефтриаксон	$y = 0,0462x + 2,6466$	0,927	11,40-34,55	99,9
Цефуроксим	$y = 0,008x + 1,2848$	0,990	93,17-282,33	99,9

Примечание: R² – коэффициент достоверности аппроксимации, АО – аналитическая область, ВЛП – внутрिलाбораторная прецизионность.

Относительное стандартное отклонение, выраженное в процентах (%), для микробиологических методов не должно превышать 5 % [1]. По результатам проведенных исследований параметр показал совпадение данных на 97,9-99,9 %, что характеризует надежность анализа.

Несмотря на то, что *S. aureus* 209 P и *B. subtilis* ATCC 6633 являются грамположительными бактериями, данные показали высокую степень сходимости результатов с *E. coli* ATCC 25922. Расчет валидационных параметров подтверждают возможность использования грамотрицательного тест-штамма для оценки антимикробной активности.

3.4 Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар с использованием в качестве тест-объектов природного тест-штамма бактерий *P. leiognathi* Sh1

Для оценки возможности определения антимикробной активности антибиотиков с использованием люминесцентного штамма, а также дальнейшей разработки методики по измерению изменения интенсивности люминесценции, были проведены следующие исследования. В качестве тест-микроорганизмов в методе диффузии в агар были использованы люминесцентные бактерии *Photobacterium leiognathi* Sh1, показавшие наибольшую активность к антибиотикам [38, 39].

В ходе исследования влияния антибиотиков на тест-штамм *P. leiognathi* Sh1 методом диффузии в агар были выявлены зоны задержки роста в концентрациях от 1 до 200 мкг/мл для антибиотиков (таблица 8).

Таблица 9 – Средние значения диаметров (d, мм) зон задержки роста *P. leiognathi* Sh1 в диапазоне концентраций 1-200 мкг/мл

	0	1	2	4	5	10	50	75	100	150	200
1	0	0	0	0,9 ± 1,0	1,9 ± 1,6	5,5 ± 1,7	7,4 ± 0,5	10,2 ± 0,5	12,9 ± 0,7	15,6 ± 0,6	24,0 ± 0,9
2	0	2,4 ± 1,5	4,8 ± 0,7	7,2 ± 0,7	8,6 ± 0,5	9,4 ± 0,2	11,7 ± 0,6	14,0 ± 1,2	21,0 ± 0,8	22,6 ± 0,9	25,0 ± 0,5
3	0	6,6 ± 0,4	11,0 ± 0,8	11,9 ± 0,8	12,1 ± 0,5	16,8 ± 0,3	27,0 ± 1,1	33,0 ± 0,6	35,8 ± 0,8	37,5 ± 0,7	39,0 ± 1,2
4	0	5,9 ± 0,7	6,1 ± 0,9	6,5 ± 0,9	7,2 ± 0,96	10,0 ± 0,6	11,7 ± 0,5	14,2 ± 0,4	16,7 ± 0,7	21,6 ± 0,4	26,7 ± 1,7
5	0	0	0	0	2,7 ± 1,4	5,3 ± 0,7	6,6 ± 0,6	9,3 ± 0,5	12,4 ± 1,8	14,6 ± 0,9	16,7 ± 0,9
6	0	4,7 ± 0,9	5,8 ± 0,2	6,2 ± 0,9	7,2 ± 0,5	8,1 ± 0,9	24,0 ± 1,2	25,2 ± 0,5	26,4 ± 0,7	30,0 ± 0,7	31,2 ± 0,7
7	0	0	0	0	0	8,0 ±	9,3 ±	12,5 ±	13,3 ±	16,0 ±	18,0 ±

						0,7	0,4	0,4	0,6	0,7	0,6
8	0	3,4 ± 0,6	5,4 ± 0,6	6,6 ± 1,1	7,4 ± 0,6	12,6 ± 0,6	19,5 ± 0,9	22,3 ± 1,1	24,0 ± 0,5	28,5 ± 0,9	29,6 ± 0,9
9	0	8,0 ± 0,7	11,8 ± 1,6	17,9 ± 0,4	19,1 ± 0,5	20,8 ± 0,9	21,8 ± 0,5	24,9 ± 0,9	25,0 ± 0,7	27,9 ± 0,6	29,1 ± 1,3
10	0	0	0	6,0 ± 0,7	8,6 ± 0,7	15,4 ± 0,7	17,0 ± 0,8	19,4 ± 0,8	20,2 ± 0,9	24,4 ± 0,5	26,8 ± 0,3

Примечание: 1 – азитромицин, 2 – гентамицин, 3 – доксициклин, 4 – пенициллин G, 5 – стрептомицин, 6 – тетрациклин, 7 – цефазолин, 8 – цефепим, 9 – цефтриаксон, 10 – цефуроксим.

Для азитромицина и цефуроксима C_{min} составила 4 мкг/мл с зонами задержки роста равными 0,9 и 6,0 мм. Дальнейшее увеличение содержания в пробе антибиотика до $C_{max} = 200$ мкг/мл приводило к увеличению d до 24,0 и 26,8 мм. Стрептомицин при 5 мкг/мл характеризовался $d = 2,7$ мм, а установленная C_{min} для цефазолина равная 10 мкг/мл – 8,0 мм.

В сравнении с патогенами было выявлено, что различные антибиотики обладают разной степенью антимикробной активности к тест-штаммам. Некоторые ФС показали более высокую активность против определенных штаммов, в то время как другие препараты проявили широкий спектр антимикробной активности ко всем объектам. Было обнаружено, что *P. leiognathi* Sh1 более чувствительный к действию пенициллина G. Гентамицин был активен в отношении всех исследованных тест-объектов, однако *S. aureus* 209 P оказался более чувствительным. Доксициклин, в сравнении с *B. subtilis* ATCC 6633 и *E. coli* ATCC 25922, был более активен в отношении люминесцентного штамма, но менее активен к *S. aureus* 209 P. Тетрациклин показал меньшую активность в отношении *B. subtilis* ATCC 6633 и *E. coli* ATCC 25922. *S. aureus* 209 P, в сравнении с люминесцентными бактериями, проявил большую чувствительность к антибиотику в низких концентрациях, но в больших концентрациях антибиотик образовывал меньшие в диаметре зоны задержки роста при инкубации. Азитромицин и

стрептомицин оказался менее чувствителен к *P. leiognathi* Sh1, в сравнении с патогенами.

Производные 7-АЦК, цефепим и цефтриаксон, показали большую активность в отношении *S. aureus* 209 P, *E. coli* ATCC 25922 и *P. leiognathi* Sh1, но меньшую активность к *B. subtilis* ATCC 6633. Цефуроксим, в сравнении с *B. subtilis* ATCC 6633 и *E. coli* ATCC 25922, был более активен в отношении люминесцентного штамма, но менее активен к *S. aureus* 209 P. Цефазолин оказал большую активность в отношении *S. aureus* 209 P и *B. subtilis* ATCC 6633, но меньшее влияние, в сравнении с люминесцентным штаммом, к *E. coli* ATCC 25922.

В результате сопоставления данных оценки антимикробной активности в отношении *S. aureus* 209 P и *P. leiognathi* Sh1 коэффициенты корреляции составили 0,804; 0,884; 0,882; 0,942; 0,973; 0,861; 0,937; 0,988; 0,987 и 0,990 для азитромицина, гентамицина, доксицилина, пенициллина G, стрептомицина, тетрациклина, цефазолина, цефепима, цефтриаксона и цефуроксима соответственно. r -Пирсона для перечисленных антибиотиков между *B. subtilis* ATCC 6633 и люминесцентным штаммом составили 0,976; 0,948; 0,937; 0,945; 0,911; 0,944; 0,947; 0,961; 0,813 и 0,880, а между грамотрицательными бактериями – *E. coli* ATCC 25922 и *P. leiognathi* Sh1 – 0,790; 0,969; 0,982; 0,919; 0,960; 0,986; 0,945; 0,950; 0,974 и 0,853.

Пригодность методики определения антимикробной активности методом диффузии в агар в отношении *P. leiognathi* Sh1 доказывали путем расчета основных валидационных характеристик методик количественного определения основных действующих веществ по параметрам: линейность, правильность, аналитическая область и внутрилабораторная прецизионность (таблица 10). Линейность и аналитическая область методики определяли путем установления зависимости влияния концентраций антибиотиков на рост тест-микроорганизмов *P. leiognathi* Sh1 в 6 пробах. R^2 находились в диапазоне 0,819-0,977.

Таблица 10 – Основные валидационные характеристики результатов эксперимента с использованием в качестве тест-объекта *P. leiognathi* Sh1

Наименование антибиотика	Уравнение линейной зависимости	R ²	АО, мкг/мл	ВЛП, %
Азитромицин	$y = 0,0072x + 1,729$	0,967	17,98-54,47	98,8
Гентамицин	$y = 0,0049x + 2,3279$	0,819	4,86-14,72	99,2
Доксициклин	$y = 0,0544x + 2,2618$	0,975	2,09-8,13	99,7
Пенициллин G	$y = 0,0601x + 1,682$	0,977	8,85-26,82	98,9
Стрептомицин	$y = 0,0058x + 1,7638$	0,869	12,91-39,37	96,5
Тетрациклин	$y = 0,0546x + 1,5987$	0,845	2,17-6,57	99,6
Цефазолин	$y = 0,004x + 2,1419$	0,902	50,59-153,28	99,8
Цефепим	$y = 0,1306x + 1,2918$	0,923	4,17-12,63	99,5
Цефтриаксон	$y = 0,0018x + 3,0383$	0,902	5,35-16,21	99,1
Цефуроксим	$y = 0,003x + 2,7127$	0,975	13,94-42,23	99,6

Примечание: R² – коэффициент достоверности аппроксимации, АО – аналитическая область, ВЛП – внутрилабораторная прецизионность.

Математическое выражение для азитромицина: $y = 0,0072x + 1,729$ с коэффициентом достоверности аппроксимации (R²) равным 0,967. Что позволяет использовать данную методику для количественного определения антибиотика в диапазоне концентраций от 17,98 до 54,47 мкг/мл (аналитическая область).

Для определения внутрилабораторной прецизионности был проведен анализ одних диапазонов концентраций в разные дни в отношении *P. leiognathi* Sh1. Он включал 6 повторных испытаний и характеризовал надежность результатов в совпадении данных более чем 96,5%.

Анализ результатов позволил обнаружить высокую степень сходимости с данными, полученными в отношении фармакопейных штаммов, а также грамотрицательных бактерий *E. coli* ATCC 25922. Возможность тестирования антибиотиков на наличие антимикробной

активности с использованием природных люминесцентных микроорганизмов *P. leiognathi* Sh1 подтверждена путем расчета основных валидационных параметров.

Люминесцентный штамм продемонстрировал высокую чувствительность к действию антибиотиков различного химического строения, что позволяет проводить оценку антимикробных свойств с использованием фармакопейного метода. Методика позволяет оценивать количественное содержание антибиотиков с использованием одного универсального тест-объекта, что ускоряет получение результатов и требует меньших затрат на исследование.

Кроме того, преимуществом использования светящихся бактерий является возможность использования вместо простейших измерительных приборов современных оптических устройств и программы, которые быстро и с высокой точностью предоставляют результаты анализа [105]. Определение антимикробной активности антибиотиков в отношении люминесцентного тест-штамма – современный автоматизированный подход, основанный на применении цифрового оборудования для обработки данных. В основе нового метода лежит использование специального устройства – видеосистемы гель-документирующей "Взгляд" с программным обеспечением (Хеликон, Россия). Это позволяет улучшить точность и повторяемость эксперимента, а также снизить влияние человеческого фактора на получаемые данные.

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ АНТИБИОТИКОВ ПО ИЗМЕРЕНИЮ ИЗМЕНЕНИЯ ИНТЕНСИВНОСТИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

4.1 Определение антимикробной активности антибиотиков по измерению изменения интенсивности бактериальной биолюминесценции *P. leiognathi* Sh1

За основу определения антимикробной активности по измерению изменения интенсивности бактериальной биолюминесценции были взяты результаты предыдущих исследований [21, 37-39].

Методом диффузии в агар было выявлено, что антибиотики оказывают влияние на рост в виде зон задержек роста в диапазоне 1-10 мкг/мл.

В ходе измерения изменения интенсивности бактериальной люминесценции тест-штамма *P. leiognathi* Sh1 под действием испытуемых растворов антибиотиков было обнаружено, что азитромицин, гентамицин, доксициклин, пенициллин G, стрептомицин, тетрациклин, цефазолин, цефепим, цефтриаксон и цефуроксим снижали свечение в концентрациях от 1 до 10 мкг/мл через 18 часов, что характеризовалось уменьшением величины БЛИ при увеличении концентрации антимикробного агента в пробе.

При 1 мкг/мл содержания антибиотиков в пробе снижение БЛИ на 50% наблюдали для пенициллина G, стрептомицина и цефепима. Снижение БЛИ на 50% для гентамицина было характерно в концентрации 4 мкг/мл. Доксициклин и цефтриаксон при 1 мкг/мл вызывали снижение свечения тест-штамма до 29,7 и 39,6% от контрольных значений. Дальнейшее увеличение концентраций до 10 мкг/мл приводило к 100% снижению люминесценции. Азитромицин и тетрациклин в исследуемом диапазоне характеризовались 100% снижением свечения уже при $C_{min} = 1$ мкг/мл. Для получения зависимости БЛИ от концентраций антибиотиков были исследованы в диапазоне 0,01-1 мкг/мл (рисунок 1).

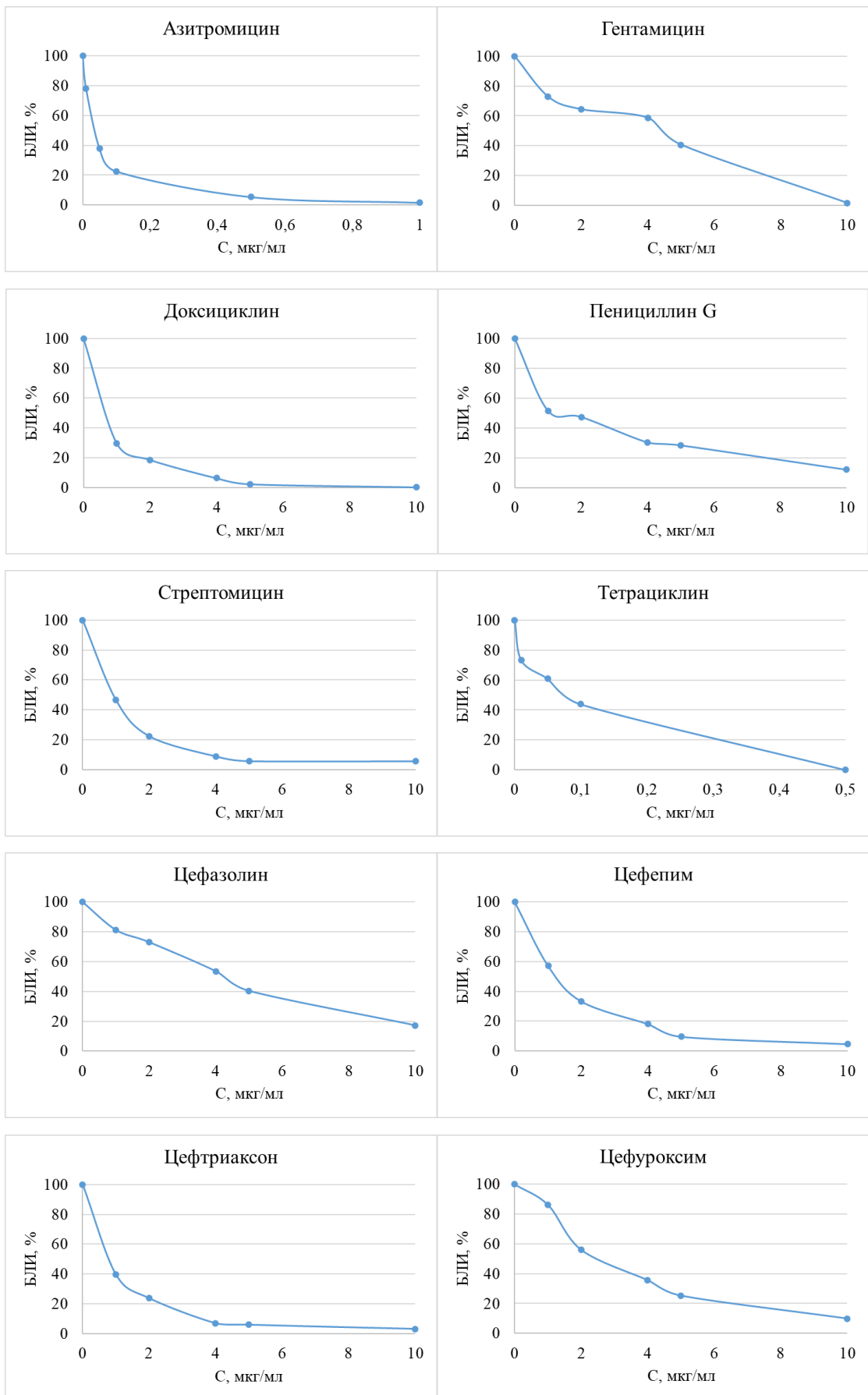


Рисунок 1. Графики зависимости биоломинесцентного индекса (БЛИ, %) от концентрации (C, мкг/мл) антибиотиков через 18 часов

В результате сравнения данных с фармакопейной методикой азитромицин, гентамицин, доксициклин, пенициллин G, стрептомицин, тетрациклин, цефазолин, цефепим, цефтриаксон и цефуроксим показали сильную обратную корреляционную взаимосвязь с r-Пирсона равными - 0,910; -0,908; -0,937; -0,966; -0,835; -0,890; -0,835; -0,906; -0,988 и -0,878 соответственно. Что подтверждает возможность использования люминесцентных бактерий *P. leiognathi* Sh1 в качестве тест-объекта для определения антимикробной активности антибиотиков по измерению изменения интенсивности люминесценции.

Новая методика определения антимикробной активности представляет собой современный автоматизированный подход, основанный на оценке результатов с использованием современного оптического оборудования. Он позволяет более точно измерять и анализировать результаты, что делает его более надежным и эффективным инструментом в научных исследованиях. Кроме того, новая методика обладает высокой чувствительностью и способностью обнаруживать даже низкие концентрации антибиотиков. Это делает его не только полезным инструментом для исследований, но и эффективным средством для контроля качества в фармацевтической промышленности.

Метод диффузии в агар имеет свои недостатки. Прежде всего, он требует большого количества времени на получение результатов. Кроме того, результаты могут быть субъективными и зависеть от опыта и мастерства исследователя. В частности, изменения в температуре и влажности могут оказывать влияние на результаты и искажать зоны ингибирования [64]. Методика определения антимикробной активности по изменению интенсивности люминесценции *P. leiognathi* Sh1, в сравнении с методом диффузии в агар, позволила сократить время на проведение исследования, в том числе, исключить необходимость длительной подготовки питательных сред и инкубирования на них микроорганизмов.

Таким образом, новая методика отличается значительной экономичностью времени и ресурсов, так как этап подготовки и анализа, в сравнении с методом диффузии в агар, не занимает несколько дней, что позволяет сосредоточиться на других аспектах исследования. По сравнению с методом диффузии в агар, новая методика способствует получению высокоточных результатов благодаря использованию современных технологий и автоматизации. Методика определения антимикробной активности по измерению изменения интенсивности люминесценции тест-штамма *P. leiognathi* Sh1 позволяет оценить количественное содержание различных антимикробных препаратов, что является важным параметром, характеризующим качество лекарственных субстанций антибиотиков.

4.2 Валидация разработанной методики биотестирования антибиотиков на наличие антимикробной активности

Описанные в Главе 4.1 исследования экспериментально показали наличие сильной прямой корреляционной взаимосвязи при оценке антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар и по измерению изменения интенсивности люминесценции с использованием тест-штамма *P. leiognathi* Sh1.

Пригодность методики определения антимикробной активности с использованием электронно-оптического оборудования по измерению изменения интенсивности люминесценции *P. leiognathi* Sh1 доказывали на основании оценки линейности, правильности, аналитической области и внутрилабораторной прецизионности, а также расчета предела обнаружения и предела количественного определения.

Для всех антибиотиков экспериментально установили зависимости по их влиянию на тест-микроорганизмы *P. leiognathi* Sh1, которые характеризовались увеличением зоны задержки роста бактерий при увеличении их концентраций в пробе для выборки $n = 10$. Для получения

линейной зависимости средние значения БЛИ были логарифмированы по натуральному основанию. R^2 составили 0,883-0,996 (таблица 11).

Таблица 11 – Основные валидационные характеристики результатов эксперимента по измерению изменения интенсивности люминесценции

P. leiognathi Sh1

Наименование антибиотика	ПО, мкг/мл	ПКО, мкг/мл	Уравнение линейной зависимости	R^2	АО, мкг/мл	ВЛП, %
Азитромицин	1,52	4,62	$y = -3,598x + 3,8463$	0,937	1,22-1,83	99,9
Гентамицин	18,22	55,21	$y = -0,4414x + 5,2692$	0,883	14,57-21,86	99,6
Доксициклин	11,44	34,66	$y = -0,5649x + 3,9614$	0,992	9,15-13,73	99,7
Пенициллин G	43,17	130,81	$y = -0,1639x + 4,1325$	0,994	34,53-51,80	99,7
Стрептомицин	10,01	30,35	$y = -0,5125x + 4,2569$	0,990	8,01-12,02	99,9
Тетрациклин	0,93	2,83	$y = -9,0035x + 4,5317$	0,996	0,75-1,12	99,6
Цефазолин	49,23	149,19	$y = -0,1767x + 4,6207$	0,994	39,38-59,08	99,6
Цефепим	24,95	75,60	$y = -0,2729x + 4,048$	0,925	19,96-29,94	99,8
Цефтриаксон	9,81	29,73	$y = -0,5042x + 4,1502$	0,976	7,85-11,77	99,9
Цефуроксим	31,69	96,03	$y = -0,233x + 4,5409$	0,980	25,35-38,03	99,8

Примечание: ПО – предел обнаружения, ПКО – предел количественного определения, R^2 – коэффициент достоверности аппроксимации, АО – аналитическая область, ВЛП – внутрилабораторная прецизионность.

Линейность методики подтверждена анализом 6 проб разных концентраций содержания антибиотика в диапазоне от 0,01 до 1 мкг/мл – для азитромицина и тетрациклина, от 1 до 10 мкг/мл – для гентамицина, доксициклина, пенициллина G, стрептомицина, тетрациклина, цефазолина, цефепима, цефтриаксона и цефуроксима.

Математические выражения, отражающие линейные зависимости между концентрациями антибиотиков в пробе и БЛИ, позволяют определять количественное содержание антибиотика в пробе. Для азитромицина

уравнение имеет следующий вид: $y = -3,598x + 3,8463$. R^2 составляет 0,937, что говорит о высокой надежности данной методики при количественном определении антибиотика в аналитической области от 1,22 до 1,83 мкг/мл.

Внутрилабораторная прецизионность определялась путем проведения анализа одних диапазонов концентраций в разное время, дни в 10 повторных испытаниях тест-штамма. По результатам проведенных исследований параметр показал совпадение данных на 99,6-99,9 %, что характеризует надежность анализа, так как относительное стандартное отклонение не должно превышать 5 % [1].

4.3 Алгоритм выполнения методики определение антимикробной активности антибиотиков по измерению изменения интенсивности бактериальной биолюминесценции

Методика определения антимикробной активности антибиотиков по измерению изменения интенсивности бактериальной биолюминесценции включает подготовку, исследование и получение результатов.

Подготовка состоит из нескольких этапов. Перед началом тестирования необходимо убедиться, что прибор находится в исправном состоянии и готов к работе. Для измерения изменения интенсивности бактериальной биолюминесценции используют биохемилюминометры, например, БХЛ-06 (НПО «Биофармаавтоматика», Россия) или LumiShot (ООО «НПП «Прикладные биосистемы», Россия). Оборудование предварительно необходимо прогреть для получения более точных результатов.

Следующий этап – подготовка образцов, включающий приготовление растворителя, тест-микроорганизмов и испытуемых растворов антибиотиков.

Растворителем для исследования выступает 3% раствор натрия хлорида. Для его приготовления необходимо растворить соль в дистиллированной воде в соотношении 3 г к 100 мл.

Подготовка тест-штамма к исследованию представляет собой посев микроорганизмов в бульон за 16-18 часов до исследования. Культивируют

бактерии в термостате при 25 °С [28] для *P. leiognathi* Sh1. По окончании инкубации наличие роста бактерий определяют визуально по помутнению жидкой питательной среды в проходящем свете, по образованию осадка оседающих бактерий или по наличию видимого в темноте свечения в синезеленой области света [11], возникающего за счет протекающей ферментативной реакции, катализируемой люциферазой [21]. Далее готовят бактериальную суспензию (БС) путем разбавления 1:50 ночной культуры тест-штамма микроорганизмов.

Для приготовления испытуемых растворов сухой порошок ФС антибиотика отвешивают в массе 10 мг на электронных весах 2-го класса точности и растворяют в растворителе. Эппендорф с полученным раствором энергично встряхивают вручную или с использованием вортекса до растворения субстанции. Из основного раствора готовят испытуемые пробы антибиотиков.

Для оценки интенсивности люминесценции, перед началом измерения, необходимо внести в кюветы люминометра, с растворами антибиотиков и контролем, бактериальную суспензию. Объем БС для биохемилюминометра БХЛ-06 составляет 50 мкл, а общий объем пробы в кювете – 1000 мкл.

Перед внесением кювет в прибор растворы перемешивали с помощью вортекса. Антимикробную активность оценивали через 15 и 30 мин, что характеризует острую токсичность, и через 24 часа. Измерения необходимо выполнять не менее чем в 3 повторах для каждой концентрации. В процессе измерения результаты фиксируют в файле Excel для дальнейшей обработки. По окончании анализа, необходимо сохранить полученные данные для последующей обработки и интерпретации, а также очистить и подготовить прибор и используемую посуду к следующему анализу.

Для оценки активности ФС рассчитывают индекс билюминесценции по формуле: $БЛИ = I_i/I_0 \times 100\%$, где I_i – интенсивность люминесценции бактерий в контроле, I_0 – интенсивность свечения бактерий в опытной пробе [21]. После получения результатов данные обрабатывают согласно

ОФС.1.1.0014.15 «Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами» [5].

4.4 Разработка проекта общей фармакопейной статьи «Определение антимикробной активности антибиотиков по измерению изменения интенсивности бактериальной биолюминесценции тест-штамма»

Настоящая фармакопейная статья может использоваться для определения антимикробной активности, контроля качества, количественного определения лекарственных субстанций антибиотиков и их препаратов.

Определение антимикробной активности антибиотиков основано на измерении снижения интенсивности люминесценции, связанной с угнетением роста микроорганизмов, под действием концентраций испытуемых веществ. Активность веществ оценивают путем расчета биолюминесцентного индекса (БЛИ), который рассчитывают по формуле: $БЛИ = I_i / I_0 \times 100\%$, где I_i – интенсивность люминесценции бактерий в контроле, I_0 – интенсивность свечения бактерий в опытной пробе. Значения испытуемых концентраций антибиотиков должны соответствовать БЛИ стандартного образца.

Антимикробная активность антибиотиков выражается мкг на единицу объема антибиотика.

Для метода диффузии в агар используют стандартные образцы, активность которых подтверждена международными биологическими и химическими стандартами. Антимикробную активность стандартных образцов антибиотиков, не имеющих аналогов в международной коллекции стандартов, рассчитывают также на основании показателей качества, установленных физико–химическими методами. Стандартные образцы антибиотиков хранятся и используются в соответствии с рекомендациями,

указанными на этикетке стандартного образца.

Методика испытания

Перед началом тестирования необходимо убедиться, что прибор находится в исправном состоянии и готов к работе. Для измерения изменения интенсивности бактериальной биолюминесценции используют биохемилюминометр БХЛ-06 (НПО «Биофармавтоматика», Н. Новгород, Россия), LumiShot (ООО «НПП «Прикладные биосистемы», Россия) и др. приборы, фиксирующие свечение бактерий. Оборудование предварительно необходимо прогреть для получения более точных результатов.

Основные растворы стандартных и испытуемых образцов готовят в стерильных растворителях с концентрацией 10 мг/мл. Полученный раствор перемешивают с использованием вортекса в течении 30 сек, для порошкообразных образцов – до растворения. Затем из основных растворов готовят рабочие испытуемые и стандартные образцы.

В кюветы биохемилюминометра БХЛ-06 или другого соответствующего прибора вносят приготовленные растворы антибиотиков с конечными концентрациями в пробе, с учетом объема бактериальной суспензии, равными испытуемым. В образцы стандартных и испытуемых растворов добавляют 50 мкл бактериальной суспензии. Общий объем проб составляет 1 мл. Контрольный образец включает 50 мкл бактериальной суспензии и 950 мкл раствора натрия хлорида. Перед внесением кювет в прибор растворы перемешивают с помощью вортекса или другого соответствующего прибора, для предупреждения оседания бактериальных клеток. Интенсивность люминесценции оценивают через 15, 30 мин (экспресс-анализ подлинности антибиотиков) или 18 часов (количественное определение не менее чем в 3 повторах для испытуемых образцов).

Измерение интенсивности свечения тест-бактерий под действием растворов антибиотиков регистрируют с помощью электронно-оптической техники, фиксирующих бактериальную биолюминесценцию тест-штаммов

(например, биохемилюминометра БХЛ-06 (НПО «Биофармаавтоматика», Россия), LumiShot (ООО «НПП «Прикладные биосистемы», Россия) и др.).

Расчет антимикробной активности испытуемых образцов по стандартной кривой может быть проведен путем непосредственного расчета с использованием уравнения графической прямой или вычисления коэффициента корреляции Пирсона (r-Пирсона).

Таблица 1 – Условия для биологического определения активности антибиотиков

Наименование антибиотика	Концентрация основного раствора, мг/мл	Концентрация антибиотика, ингибирующая 50% люминесценции, мкг/мл	Рекомендуемый диапазон концентраций, мкг/мл
Азитромицин	1	0,03	0,01-1
Гентамицин	10	3,05	1-10
Доксициклин	10	0,20	0,01-1
Пенициллин G	10	1,35	1-10
Стрептомицин	10	0,34	0,02-5
Тетрациклин	1	0,05	0,01-1
Цефазолин	10	3,70	1-10
Цефепим	10	1,11	1-10
Цефтриаксон	10	0,43	0,5-10
Цефуроксим	10	2,65	1-10

Определение антимикробной активности антибиотиков путем непосредственного расчета с использованием уравнения графической прямой

Для проведения испытания готовят растворы стандартного и испытуемого образцов. Концентрации растворов должны быть близки к

контрольным концентрациям растворов стандартных образцов, указанных в таблице 1.

Все растворы стандартного и испытуемого образцов вносят в кюветы люминометра. Для обеспечения статистической достоверности результатов рекомендуется готовить растворы испытуемого образца в трех повторах. Непосредственно перед измерением вносят бактериальную суспензию.

Расчет активности и дисперсионный анализ по стандартной кривой, путем непосредственного расчета с использованием уравнения графической прямой, осуществляют в соответствии со статьей ОФС «Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами».

Результаты измерений представляют в виде биолюминесцентного индекса, измеряемого в процентах (БЛИ, %) и вычисляемого по формуле: $БЛИ = I_i/I_0 \times 100\%$, где I_i – интенсивность люминесценции бактерий в опытной пробе, I_0 – интенсивность свечения бактерий в контроле.

Взаимосвязь между БЛИ и концентрациями антибиотиков должна быть представлена в виде прямой, аналогичной стандартным образцам, в виде линейной или экспоненциальной, во всем диапазоне исследованных концентрациях.

Определение антимикробной активности антибиотиков путем вычисления коэффициента корреляции Пирсона (r-Пирсона)

Для проведения испытания готовят растворы стандартного и испытуемого образцов. Концентрации растворов должны быть близки к контрольным концентрациям растворов стандартных образцов, указанных в таблице 1.

Все растворы стандартного и испытуемого образцов вносят в кюветы люминометра. Для обеспечения статистической достоверности результатов рекомендуется готовить растворы испытуемого образца в трех повторах. Непосредственно перед измерением вносят бактериальную суспензию.

Результаты измерений представляют в виде биолюминесцентного индекса, измеряемого в процентах (БЛИ, %) и вычисляемого по формуле: $\text{БЛИ} = I_i/I_0 \times 100\%$, где I_i – интенсивность люминесценции бактерий в опытной пробе, I_0 – интенсивность свечения бактерий в контроле.

Взаимосвязь между БЛИ стандартного и испытуемого образцов антибиотиков доказывают путем расчета r -Пирсона по формуле:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_n - \bar{x})(y_n - \bar{y})}{n\sigma_x\sigma_y},$$

где n — число статистических наблюдений, x и y — случайные переменные.

Значения коэффициента корреляции всегда расположены в диапазоне от -1 до 1 и интерпретируются следующим образом: если коэффициент корреляции близок к 1, то между переменными наблюдается положительная корреляция.

Расчет антимикробной активности испытуемого образца путем непосредственного расчета с использованием уравнения графической прямой

Пример. Определение антимикробной активности по измерению изменению интенсивности бактериальной биолюминесценции тест-штамма *P. leiognathi* Sh1 под действием рабочих концентраций гентамицина. Антибиотик оказывал влияние в диапазоне концентраций через 18 часов от 1 до 10 мкг/мл. Для испытуемого образца значения БЛИ составили от 100 до 1,5 %, а для стандартного образца – от 100 до 2,3 %.

Линейные зависимости между концентрациями испытуемого и стандартного образцов антибиотиков и величинами зон задержки роста показаны на графике 1.

Таблица 1 – Значения интенсивности люминесценции тест-штамма *P. leiognathi* Sh1 под действием гентамицина через 18 часов.

Концентрация, мкг/мл	Исследуемый образец		Стандартный образец	
	I _{ср}	БЛИ, %	I _i	БЛИ, %
0	132,3	100	128	100
1	96,4	72,9	96	75
2	85,2	64,4	85	66,4
4	77,6	58,7	78	60,9
5	53,7	40,6	54	42,2
10	2,0	1,5	3	2,3

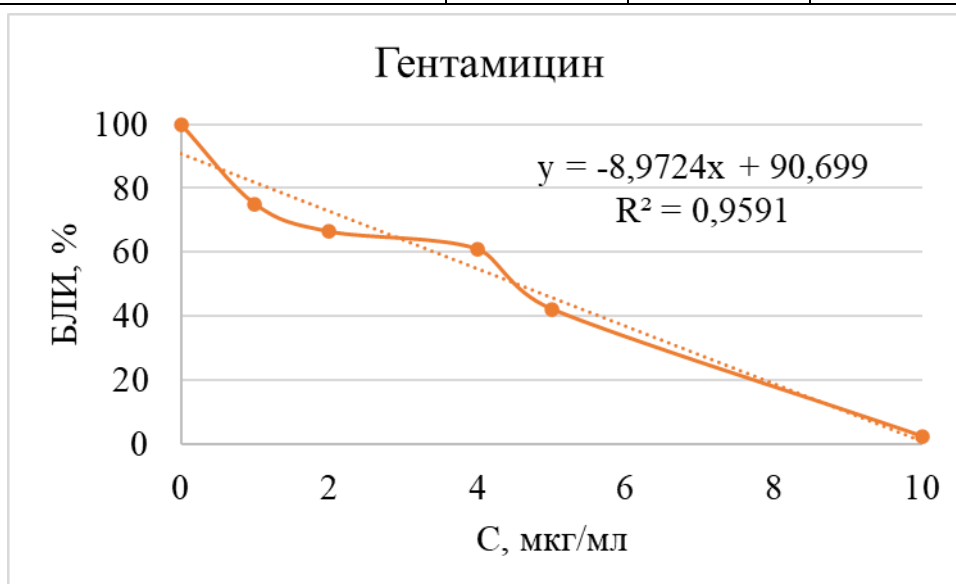


График 1. Градуировочная зависимость БЛИ от концентраций для стандартного образца гентамицина.

Полученное математическое уравнение для зависимости БЛИ от концентраций позволяет определять содержание антибиотика в пробе по величине отклика аналитического сигнала, являющегося «х» в уравнении. Если для линейного уравнения $y = -8,9724x + 90,699$ интенсивность свечения в % опытного образца составляет 50 в сравнении с контролем, то концентрация антибиотика будет составлять около 4,54 мкг/мл.

Расчет антимикробной активности испытуемого образца путем вычисления коэффициента корреляции Пирсона (r-Пирсона)

Пример. Определение антимикробной активности по измерению изменению интенсивности бактериальной биолюминесценции тест-штамма *P. leiognathi* Sh1 под действием рабочих концентраций гентамицина. Антибиотик оказывал влияние в диапазоне концентраций через 18 часов от 1 до 10 мкг/мл. Для испытуемого образца значения БЛИ составили от 100 до 1,5 %, а для стандартного образца – от 100 до 2,3 %.

Таблица 1 – Значения интенсивности люминесценции тест-штамма *P. leiognathi* Sh1 под действием гентамицина через 18 часов.

Концентрация, мкг/мл	Исследуемый образец		Стандартный образец	
	I _{ср}	БЛИ, %	I _с	БЛИ, %
0	132,3	100	128	100
1	96,4	72,9	96	75
2	85,2	64,4	85	66,4
4	77,6	58,7	78	60,9
5	53,7	40,6	54	42,2
10	2,0	1,5	3	2,3

Наличие сходимости значений доказывают в результате расчета коэффициента корреляции Пирсона. Для доксицилина r составил 0,99, что говорит о высокой степени сходимости результатов и подтверждает антимикробные свойства и качество испытуемого образца.

Условия культивирования биолюминесцентного тест-штамма, используемого для определения антимикробной активности антибиотиков

Для культивирования биолюминесцентных тест-штаммов используют питательные среды следующего состава: натрия хлорид, натрия гидрофосфат, калия дигидроортофосфат, сульфат магния, глицерин, дрожжевой экстракт. Твердые питательные среды готовят с добавлением

агара. Рекомендуется использовать Nutrient agar M001-500G (Himedia, Индия, lot: 0000387742), которые представляют собой высушенные и измельченные до порошкообразного состояния готовые питательные среды. Преимуществами сухих питательных сред является простота изготовления сред для тестирования, а также стандартность состава и условий изготовления. В состав среды Nutrient agar M001-500G входит:

- пептический перевар животной ткани: 5,00 г/л;
- мясной экстракт: 1,50 г/л;
- дрожжевой экстракт: 1,50 г/л;
- натрия хлорид: 5,00 г/л;
- агар-агар: г/л.

Согласно инструкции, порошок растворяют в дистиллированной воде в соотношении 28,0 грамм к 1 литру. Для культивирования *P. leiognathi* Sh1 питательные среды добавляют натрия хлорид в количестве 3% соответственно от общего объема, что является оптимальным условием для достижения максимальной интенсивности свечения данного тест-штамма. Полученный мутный раствор перемешивают вручную или механическим способом с использованием орбитального шейкера Biosan со скоростью 180 об/мин и нагревают до кипения на водяной бане. Готовый светло-янтарный прозрачный раствор стерилизуют кипячением 2-3 дня или автоклавированием при 1,1 атм в течение 15 минут. Полученную стерильную расплавленную питательную среду разливают в стерильные чашки Петри.

В качестве готовых сухих порошков для бульона используют Nutrient Broth M002-500G (Himedia, Индия, lot: 0000387742). 13,0 грамм порошка растворяют в 1000 мл воды дистиллированной, добавляют натрия хлорид с содержанием 3% для природного тест-штамма. Приготовленный раствор стерилизуют, аналогичным для твердой питательной среды способом, кипячением или в автоклаве. Готовые жидкие питательные среды разливают в стерильном боксе во флаконы.

Культивируют бактерии в термостатах, в подходящих для микроорганизмов условиях, при температуре 25 °С для *P. leiognathi* Sh1 до 18-20 часов.

По окончании инкубации наличие роста микроорганизмов определяют визуально по помутнению питательной среды в проходящем свете или наличию роста в виде осадка. Помимо этого, показателем служит также наличие видимого в темноте свечения в сине-зеленой области света, возникающего за счет протекающей ферментативной реакции, катализируемой люциферазой. Одной из важнейших характеристик при их идентификации природного люминесцентного штамма *P. leiognathi* Sh1 являются значения оптической плотности (0,61) и удельного свечения ($8,09 \cdot 10^{-5}$ мВ/кл).

Для определения антимикробной активности тест-микробы высевают в бульон, затем через 18–20 ч инкубации при температуре 25 °С. После культивирования оценивают морфологические свойства выращенных микроорганизмов на поверхности агара. Природные штаммы биолюминесцентных бактерий *P. leiognathi* Sh1 должны представлять собой слизистой консистенцией клетки круглой формой, диаметр которых составляет 1,3 мм.

Питательные среды и растворители

В таблице 2 представлен состав сред, используемых для культивирования и исследования антимикробных свойств.

Таблица 2 – Состав питательных сред для выращивания тест-микроорганизмов и определения активности антибиотиков.

<i>P. leiognathi</i> Sh1			
Жидкая питательная среда		Твердая питательная среда	
NaCl	30,0	NaCl	30,0
Na ₂ HPO ₄	7,0	Na ₂ HPO ₄	7,0
KH ₂ PO ₄	1,0	KH ₂ PO ₄	1,0

(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,5	(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄	0,1	MgSO ₄	0,1
глицерин	3,0 мл	глицерин	3,0 мл
дрожжевой экстракт	0,5	дрожжевой экстракт	0,5
пептон	5,0	пептон	5,0
дистиллированная вода	1,0 л	дистиллированная вода	1,0 л
		агар	15,0
pH	7,2	pH	7,2

Для приготовления сред используют Nutrient agar M001-500G (HiMedia, Индия, lot: 0000387742), состав среды Nutrient agar M001-500G входит:

- пептический перевар животной ткани: 5,00 г/л;
- мясной экстракт: 1,50 г/л;
- дрожжевой экстракт: 1,50 г/л;
- натрия хлорид: 5,00 г/л;
- агар-агар: г/л.

Приготовление сред на основе Nutrient agar M001-500G для *P. leiognathi* Sh1 требует добавление 2,5 г натрия хлорида на 100 мл среды, что является оптимальным условием для культивирования и достижения максимального свечения микроорганизмов.

Методика приготовления состоит в следующем: 28,0 грамм сухого порошка растворяют в 1 литре дистиллированной воды. Для культивирования *P. leiognathi* Sh1 в питательные среды добавляют 25 г натрия хлорида. Полученный мутный раствор перемешивают вручную или механическим способом с использованием орбитального шейкера Biosan со скоростью 180 об/мин и нагревают до кипения на водяной бане. Готовый светло-янтарный прозрачный раствор стерилизуют кипячением 2-3 дня или автоклавированием при 1,1 атм в течение 15 минут. Полученный стерильный расплавленный агар разливают в стерильные чашки Петри и используют для культивирования микроорганизмов или определения антимикробной активности методом диффузии в агар. В случае необходимости определяют

pH сред потенциометрическим методом со стеклянными электродами или колориметрически. Устанавливают pH хлористоводородной кислотой или раствором натрия гидроксида.

Хранение культур биолюминесцентных тест-микроорганизмов.

Тест-штаммы микроорганизмов хранят в герметично обмотанных пленкой Парафильм М (50 мм x 75 мм, PCGroup) чашках Петри на соответствующих плотных питательных средах не более 14 сут при температуре от 4 до 10 °С, после чего пересевают на свежую питательную среду. Рекомендательными условиями хранения являются «обновление» культур на чашки каждые 2 недели и специальных «музеев» для длительного хранения – раз в 1 год.

ВЫВОДЫ

Таким образом, проведенное исследование по разработке методик оценки антимикробной активности с использованием природных биолюминесцентных бактерий позволило сделать следующие общие выводы:

1. Изучена антимикробная активность антибиотиков методом диффузии в агар с использованием в качестве объектов рекомендованных ГФ тест-штаммов микроорганизмов – *S. aureus* 209 P, *B. subtilis* ATCC 6633. Было выявлено, что исследования с использованием патогенных микроорганизмов показали большой разброс значений повторов, что приводит к отклонению достоверности полученных данных.

2. Впервые обосновано использование грамотрицательного штамма *E. coli* ATCC 25922 как тест-микроорганизма для определения антимикробной активности методом диффузии в агар. Сильную степень корреляционной взаимосвязи показали результаты оценки антимикробной активности антибиотиков, полученные методом диффузии в агар, в отношении *S. aureus* 209 P и *E. coli* ATCC 25922 – в пределах от 0,917 до 0,995, в отношении *B. subtilis* ATCC 6633 и *E. coli* ATCC 25922 – от 0,912 до 0,996. Для всех антибиотиков экспериментально установили диапазоны концентраций выявления диаметров зон задержки роста штамма, а также рассчитаны валидационные параметры методики.

3. Впервые изучена антимикробная активность 10 антибиотиков методом диффузии в агар с использованием в качестве тест-объектов биолюминесцентных бактерий Азовского моря *P. leiognathi* Sh1. Доказана возможность применения люминесцентного тест-штамма *P. leiognathi* Sh1 для определения антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агара на основании высокой степени сходимости полученных результатов между зонами задержки роста для *S. aureus* 209 P, *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 25922 и *P. leiognathi* Sh1 с коэффициентами корреляции Пирсона от 0,790 до 0,990. Люминесцентный штамм

продemonстрировал высокую чувствительность к действию антибиотиков различного химического строения, что позволяет проводить оценку антимикробных свойств с использованием фармакопейного метода и оценивать количественное содержание антибиотиков с использованием одного универсального тест-объекта. Кроме того, преимуществом использования светящихся бактерий является возможность использования вместо простейших измерительных приборов современных оптических устройств и программы, которые быстро и с высокой точностью предоставляют результаты анализа.

4. Впервые оценена антимикробная активность антибиотиков в отношении биолюминесцентного природного тест-штамма *P. leiognathi* Sh1 по изменению интенсивности люминесценции. Выявлена обратная сильная корреляционная взаимосвязь с r -Пирсона от $-0,835$ до $-0,986$ при сравнении результатов анализа двух методов по оценке антимикробной активности антибиотиков с применением люминесцентного тест-штамма *P. leiognathi* Sh1, демонстрирующая возможность применения методики по изменению БЛИ для оценки антимикробного действия. Методика определения антимикробной активности по изменению интенсивности люминесценции в сравнении с методом диффузии в агар позволила сократить время на проведение исследования, в том числе, исключить необходимость длительной подготовки питательных сред и инкубирования на них микроорганизмов.

5. Впервые разработана методика оценки антимикробной активности антибиотиков с использованием биолюминесцентного тест-штамма бактерий. Рассчитаны валидационные параметры методики определения антимикробной активности антибиотиков по измерению изменения интенсивности люминесценции: предел обнаружения, предел количественного определения, аналитическая область, линейность, правильность и промежуточную (внутрилабораторную) прецизионность, показывающие ее пригодность.

6. Разработан проект общей фармакопейной статьи «Определение антимикробной активности антибиотиков по изменению интенсивности бактериальной биолюминесценции тест-штамма».

Перспективы дальнейшей разработки темы. Разработанная методика определения антимикробной активности антибиотиков по изменению интенсивности бактериальной биолюминесценции тест-штамма *P. leiognathi* Sh1 может быть использована для определения антимикробной активности у антибиотиков, известных фармацевтических субстанций не антибиотиков и вновь синтезируемых соединений, а также скрининга синтезируемых веществ и мониторинга загрязнения окружающей среды веществами с выраженными антимикробными свойствами.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящем отчете о НИР применяют следующие сокращения и обозначения:

C – концентрация.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute – Институт клинических и лабораторных стандартов.

C_{min} – минимально исследованная концентрация.

C_{max} – максимально исследованная концентрация.

d – диаметр зон задержки роста микроорганизмов.

EUCAST – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – Европейский комитет по определению чувствительности к антимикробным препаратам.

pH – водородный показатель.

R^2 – коэффициент достоверности аппроксимации.

6-АПК – производные 6-аминопенициллановой кислоты.

7-АЦК – производные 7-аминоцефалоспориновой кислоты.

АГ – производные аминогликозидов.

АО – аналитическая область.

БЛИ – биолюминесцентный индекс.

БХЛ-06 – биохемилюминометр.

ВЛП – внутрилабораторная прецизионность.

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография.

ГФ – Государственная Фармакопея.

ЕД – единицы действия.

КФУ – Крымский федеральный университет.

Л-БАТ – лаборатория биохемилюминесцентных аналитических технологий.

ЛП – лекарственный препарат.

мг – объем миллиграмм.

МИК – минимально ингибирующая концентрация.

МИК-50 – минимальная концентрация антибиотика, при которой подавляется рост бактерий на 50%.

МИК-90 – минимальная концентрация антибиотика, при которой подавляется рост бактерий на 90%.

мкг – объем микрограмм.

мкл – объем в микролитрах.

ОФС – общая фармакопейная статья.

ПК – пороговая концентрация.

ПКО – предел количественного определения.

ПО – предел обнаружения.

ПС – питательная среда.

РФ – Российская Федерация.

ФГАОУ ВО – Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования.

ФС – фармацевтическая субстанция.

ЭК₅₀ – полумаксимальная эффективная концентрация.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения. – М.: Госстандарт России; Изд-во стандартов, 2002. – 11 с.
2. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XV издание. Т. 2. [Электронный ресурс]. – 2023. – URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/2/2-1/streptomitsina-sulfat/> (дата обращения 20.04.2024).
3. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV издание / Государственное учреждение Российская Федерация Федеральный центр научно-технической информации по лекарственным средствам, медицинским изделиям и веществам. – Москва, 2018. – Том 1. – С. 1272–1277.
4. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XV издание. Т. 2. [Электронный ресурс]. – 2023. – URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/2/2-1/gentamitsina-sulfat/> (дата обращения 20.04.2024).
5. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XV издание. Т. 1. [Электронный ресурс]. – 2023. – URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-1/validatsiya-analiticheskikh-metodik/> (дата обращения 20.04.2024).
6. European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 10th Edition / European Directorate for the Quality of Medicines. – Strasbourg, 2019. – P. 3029–3030.
7. European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 10th Edition / European Directorate for the Quality of Medicines. – Strasbourg, 2019. – P. 2742.
8. European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 10th Edition / European Directorate for the Quality of Medicines. – Strasbourg, 2019. – P. 3902.

9. ISO/TS 20281:2006. Water quality. Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data: publication date: 2006-04. – URL: <https://www.iso.org/standard/34121.html> (дата обращения 20.04.2024).

10. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 91 с.

11. Абдураманова, Э.Р. Функциональные характеристики крайних и иммобилизованных на неорганических носителях фотобактерий Черного и Азовского моря / Э.Р. Абдураманова, Н.В. Наумова, Л.М. Дерзян, А.М. Кацев // Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. Биология. Химия. – 2018. – №1. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/funktsionalnye-harakteristiki-svobodnyh-i-immobilizovannyh-na-neorganicheskikh-nositelyah-fotobakteriy-chernogo-i-azovskogo-morey> (дата обращения: 20.04.2024).

12. Абитаева, Г.К. Новые стратегии борьбы со стафилококковыми инфекциями / Г.К. Абитаева, Д. Буланин, Е.В. Марченко, Л. Вангелиста // Астана медициналық журналы. – 2020. – №3. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/novye-strategii-borby-so-stafilokokkovymi-infektsiyami> (дата обращения: 20.04.2024).

13. Алешина, Е.С. Методы биолюминесцентного тестирования: методические указания к лабораторному практикуму / Е.С. Алешина, И.Ф. Каримов, Д.Г. Дерябин; Оренбургский государственный университет. – Оренбург: ОГУ, 2011. – 56 с.

14. Алсовэйд, А.К. Методы и подходы для определения антибиотиков / А.К. Алсовэйд, О.А. Караваева, О.И. Гулий. – DOI: 10.37489/0235-2990-2022-67-1-2-53-61 // Антибиотики и Химиотерапия. – 2022. – Т. 67, № 1-2. – С. 53–61.

15. Антоновская, Л.И. Выбор методов, условий испытаний и параметров оценки антибактериальных свойств биоцидных препаратов / Л.И. Антоновская, Н.А. Беясова // Труды БГТУ. Серия 2: Химические

технологии, биотехнология, геоэкология. – 2011. – №4. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/vybor-metodov-usloviy-ispytaniy-i-parametrov-otsenki-antibakterialnyh-svoystv-biotsidnyh-preparatov> (дата обращения: 20.04.2024).

16. Биглова, Ю.Р. Неспецифические примеси в фармацевтических субстанциях: особенности методик их определения / Ю.Р. Биглова, Н.В. Гадасина, Т.Н. Боковикова [и др.] – DOI: 10.30895/1991-2919-2019-9-3-153-161 // Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2019. – № 9(3). – С. 153–161.

17. Виллс, Д. Определение примесей в медикаментах на масс-спектрометре с ИСП Thermo Scientific iCAP Qc. Д. Виллс, Д. Катчер, Г. Лекорне // Аналитика. – 2013. – № 6 (13). – С. 36–43.

18. Галяутдинова, Ю.А. Гены резистентности бактерий к антибиотикам / Ю.А. Галяутдинова // Форум молодых ученых. – Саратов, 2018. – №12-2 (28). – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/geny-rezistentnosti-bakteriy-k-antibiotikam> (дата обращения: 20.04.2024).

19. Герна, Р. Хранение микроорганизмов. Методы общей бактериологии: пер. с англ. / Р. Герна, под ред. Ф. Герхардта [и др.]. – Москва: Мир, 1983. – 534 с.

20. Давидович, Н.В. Основные принципы эволюции антибиотикорезистентности у бактерий (обзор литературы) / Н.В. Давидович, Н.Н. Кукалевская, Е.Н. Башилова, Т.А. Бажукова // Клиническая лабораторная диагностика. – 2020. – №6. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/osnovnyye-printsipy-evolyutsii-antibiotikorezistentnosti-u-bakteriy-obzor-literatury> (дата обращения: 20.04.2024).

21. Дерябин, Д.Г. Бактериальная биолюминесценция: фундаментальные и прикладные аспекты / Д.Г. Дерябин. – М.: Наука, 2009. – 152 с.

22. Жданова, О.С. Антибиотикорезистентность штаммов *Pseudomonas aeruginosa* с разной способностью к синтезу пиоцианина / О.С. Жданова, Е.П. Красноженов, Э.А. Соснин [и др.] // Альманах клинической медицины. – 2013. – №28. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/antibiotikorezistentnost-shtammov-pseudomonas-aeruginosa-s-raznoy-sposobnostyu-k-sintezu-piotsianina> (дата обращения: 20.04.2024).

23. Захарова, Т.Л. Использование рекомбинантных штаммов для одновременного получения нескольких очищенных основных протективных антигенов холерного вибриона / Т.Л. Захарова, С.П. Заднова, Л.Ф. Ливанова [и др.]. – DOI: 10.21055/0370-1069-2009-2(100)-68-71 // Проблемы особо опасных инфекций. – 2009. – №2. – С. 68–71.

24. Иванова, О.А. Анализ уровня информированности практических врачей о рациональной фармакотерапии в современных условиях / О.А. Иванова, А.Э. Авакян, И.В. Иванова // Сибирское медицинское обозрение. – 2005. – №1. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/analiz-urovnya-informirovannosti-prakticheskikh-vrachey-o-ratsionalnoy-farmakoterapii-v-sovremennyh-usloviyah> (дата обращения: 20.04.2024).

25. Игнатенко, А.В. Анализ антибиотикорезистентности микроорганизмов *E. coli* / А.В. Игнатенко, Н.М. Аль-Хаммаш // Труды БГТУ. Серия 2: Химические технологии, биотехнология, геоэкология. – 2012. – №4. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/analiz-antibiotikorezistentnosti-mikroorganizmov-e-coli> (дата обращения: 20.04.2024).

26. Кацев, А.М. Оценка применимости биоллюминесцентного анализа при определении активности лекарственных препаратов / А.М. Кацев, С.Л. Сафронюк [и др.] // Ветеринарна біотехнологія. – 2013. – № 22 (22). – С. 188–195.

27. Кацев, А.М. Идентификация светящихся бактерий, выделенных из Черного и Азовского морей / А. М. Кацев, Д. Макемсон // Ученые записки

Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. Биология. Химия. – 2006. – Т. 19, № 4. – С. 111–116.

28. Малыгина, И.Ю. Светящиеся бактерии Черного и Азовского морей / И.Ю. Малыгина, А.М. Кацев // Экология моря: Сб. науч. тр. ИнБЮМ. – 2003. – Вып. 64. – С. 18–23. – ISSN 0203-4646.

29. Общая медицинская микробиология: учеб.-метод. пособие / Ж.Г. Шабан. [и др.]. – Минск: БГМУ, 2011. – 320 с.

30. Панин, Н.В. Пенициллинацилаза: ретроспектива изучения кинетики и термодинамики практически значимых реакций / Н.В. Панин, Д.Ф. Гуранда, И.В. Шаповалова, В.-Ю.К. Швядас // Вестник Московского университета. Серия 2. Химия. – 2023. – №4. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/penitsillinatsilaza-retrospektiva-izucheniya-kinetiki-i-termodynamiki-prakticheski-znachimyh-reaktsiy> (дата обращения: 20.04.2024).

31. Поляк, М.С. Питательные среды для медицинской и санитарной микробиологии / М.С. Поляк, В.И. Сухаревич, М.Э. Сухаревич. – Санкт-Петербург: ЭЛБИ-СПб, 2008. – 352 с. ISBN 978-5-93979-194-6.

32. Приготовление питательных сред и культивирование микроорганизмов: методические указания к выполнению лабораторной работы по дисциплинам «Микробиология», «Фармакология, биохимия, микробиология» и «Биотехнология» для студентов ИПР, ИФВТ дневной формы обучения. – Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2015. – 19 с.

33. Пшеничнов, Р.А. Микробиолюминесценция: оптимизация сенсоров и расширение сферы использования реакции / Р.А. Пшеничнов, И.Л. Масленникова, Н.М. Никитина; Российская академия наук, Уральское отделение, Институт экологии и генетики микроорганизмов [и др.] – Пермь: ИЭГМ УрО РАН, 2005. – 76 с.

34. Решедько, Г.К. *Escherichia coli* как возбудитель нозокомиальных инфекций в ОРИТ / Г.К. Решедько, А.Г. Щебников, М.В. Морозов, Л.А.

Решедько // КМАХ. – 2011. – №4. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/escherichia-coli-kak-vozbuditel-nozokomialnyh-infektsiy-v-orit> (дата обращения: 20.04.2024).

35. Родичева, Э.К. Билюминесцентные биотесты на основе светящихся бактерий для экологического мониторинга / Э.К. Родичева, А.М. Кузнецов, С.Е. Медведева // Вестник ОГУ. – 2004. – №5. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/biolyuminestsentnye-biotesty-na-osnove-svetyaschihsya-bakteriy-dlya-ekologicheskogo-monitoringa> (дата обращения: 20.04.2024).

36. Руднев, В.А. Инфекции в ОРИТ в России: результаты национального многоцентрового исследования / В.А. Руднев, Д.В. Бельский, А.В. Дехнич // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2011. – Т. 1., № 13 (4). – С. 294–303.

37. Самолюк В.В. Оценка активности лекарственных препаратов с помощью биотестов на основе новых морских люминесцентных бактерий, выделенных из акваторий Азовского и Черного морей // Молодая наука. Сборник трудов научно-практической конференции для студентов и молодых ученых / научн. ред. Н.Г. Гончарова; редкол.: Г.А. Штофер, О.В. Красникова, Д.В. Шадуро. – Симферополь: Общество с ограниченной ответственностью «Издательство Типография «Ариал», 2019. – С. 175–177.

38. Сафронюк, С.Л. Использование билюминесцентных бактерий для оценки антибиотических эффектов лекарственных препаратов / С.Л. Сафронюк, Ю.Ю. Гавриченко, А.М. Кацев // Вестник ВГУ, серия: Химия. Биология. Фармация. – Воронеж, 2018. – № 1. – С. 194–203.

39. Сафронюк, С.Л. Новые подходы к изучению биологической активности лекарственных веществ с использованием природных и генно-инженерных билюминесцентных бактерий / С.Л. Сафронюк, А.М. Кацев // АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ И ХИМИИ. – 2017. – №. 1. – С. 502–507. – URL:

<https://icrtjournal.com/ru/nauka/article/54228/view> (дата обращения: 20.04.2024).

40. Сухорукова, М.В. Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам: что стоит за результатом / М.В. Сухорукова // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2013. – Т. 15, № 3. – С. 219–229.

41. Фаращук, Н.Ф. Современные, наиболее употребляемые лабораторные методы исследования антибиотиков / Н.Ф. Фаращук, Ю.П. Цюман // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2012. – № 4 (11). – С. 58–63.

42. Яковлев, С. В. Устойчивость *Pseudomonas aeruginosa* к карбапенемам: уроки исследования. MYSTIC // Фарматека. – Москва, 2007. – № 8/9. – С. 56–62.

43. Aaron, S.E. Establishment of an EC₅₀ database of pesticides using a *Vibrio fischeri* bioluminescence method / S.E. Aaron, K. Tosheska-Trajkovska, S. Cekovska, J.-J. Aaron // Luminescence. – 2019. – Vol. 34, № 5. – P. 508–511. – DOI: 10.1002/bio.3628.

44. Акпака, P.E. Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from Bermuda / P.E. Акпака, S. Kissoon, C. Wilson // PLoS One. – 2017. – Vol. 12, № 3. – P. 0171317. – DOI: 10.1371/journal.pone.0171317.

45. Arsene, M.M.J. Prolonged Exposure to Antimicrobials Induces Changes in Susceptibility to Antibiotics, Biofilm Formation and Pathogenicity in *Staphylococcus aureus* / M.M.J. Arsene, I. Podoprigora, E.G. Volina // Journal of Pharmaceutical Research International. – 2021. – Vol. 33, № 34B. – P. 140–151. – DOI: 10.9734/JPRI/2021/v33i34B31856.

46. Ardila, C.M. High resistance against clindamycin, metronidazole and amoxicillin in *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* isolates of periodontal disease / C.M. Ardila, M.A. López,

I.C. Guzmán // Medicina oral, patología oral y cirugía bucal. – 2010. – Vol. 15, № 6. – P. 947–951.

47. Auger, S. Biofilm formation and cell surface properties among pathogenic and nonpathogenic strains of the *Bacillus cereus* group / S. Auger, N. Ramarao, C. Faille [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2009. – Vol. 75, № 20. – P. 6616–6618. – DOI: 10.1128/AEM.00155-09.

48. Balouiri, M. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review / M. Balouiri, M. Sadiki, S. K. Ibsouda // J. Pharm. Anal. – 2016. – Vol. 6(2). – P. 71–79.

49. Basu, O.D. Potential Aquatic Health Impacts of Selected Dechlorination Chemicals / O.D. Basu, S. Dorner // Water Quality Research Journal of Canada. – 2010. – Vol. 45, № 3. – P. 353–363. – DOI: 10.2166/wqrj.2010.036.

50. Bechor, O. Recombinant microorganisms as environmental biosensors pollutants detection by *E. coli* bearing *fabA:lux* fusion / O. Bechor, D.R. Smulski, T.K.V. Dyk, R.A. LaRossa, S. Belkin // Biotechnology. – 2002. – Vol. 94, № 1. – P. 125–132. – DOI: 10.1016/s0168-1656(01)00423-0.

51. Bentley, R. What Is an Antibiotic? Revisited / R. Bentley, J.W. Bennett // Advances in Applied Microbiology. – 2003. – P. 303–331. – DOI: 10.1016/s0065-2164(03)01012-8.

52. Ben-David, A. Estimation method for serial dilution experiments / A. Ben-David, C.E. Davidson // J Microbiol Methods. – 2014. – Vol. 107. – P. 214–221. – DOI: 10.1016/j.mimet.2014.08.023.

53. Ben-Israel, O. Identification and quantification of toxic chemicals by use of *Escherichia coli* carrying *lux* genes fused to stress promoters / O. Ben-Israel, H. Ben-Israel, S. Ulitzur // Appl Environ Microbiol. – 1998. – Vol. 64, № 11. – P. 4346–4352. – DOI: 10.1128/AEM.64.11.4346-4352.1998.

54. Bezshapochnyy, S. Opportunities and prospects of microbiological diagnosis of ent organs mycoses (review) / S. Bezshapochnyy, O. Podovzhnii, V. Polianska [et al.] // Georgian Med News. – 2020. – Vol. 308. – P. 36–43.

55. Bhargav, H.S. Measurement of the Zone of Inhibition of an Antibiotic / H.S. Bhargav, S.D. Shastri, S.P. Poornav // 2016 IEEE 6th International Conference on Advanced Computing (IACC). – 2016. – P. 409–414. – DOI: 10.1109/IACC.2016.82.
56. Blázquez, J. Antibiotic-induced genetic variation: how it arises and how it can be prevented / J. Blázquez, J. Rodríguez-Beltrán, I. Matic // Annu. Rev. Microbiol. – 2018. – Vol. 72. – P. 209–230. DOI: 10.1146/annurev-micro-090817-062139.
57. Bonev, B. Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method / B. Bonev, J. Hooper, J. Parisot // J Antimicrob Chemother. – 2008. – Vol. 61, № 6. – P. 1295–1301. – DOI: 10.1093/jac/dkn090.
58. Borriss, R. *Bacillus subtilis*, the model Gram-positive bacterium: 20 years of annotation refinement / R. Borriss, A. Danchin, C.R. Harwood [et al.] // Microbial Biotechnology. – 2018. – Vol. 11, № 1. – P. 3–17. – DOI: 10.1111/1751-7915.13043.
59. Bulich, A.A. Use of the luminescent bacterial system for the rapid assessment of aquatic toxicity / A.A. Bulich, D.L. Isenberg // ISA Trans. – 1981. – Vol. 20, № 1. P. 29–33.
60. Cooney, S. Bacteria: Other Pathogenic *Enterobacteriaceae* – *Enterobacter* and Other Genera / S. Cooney, S. O'Brien, C. Iversen, S. Fanning // Encyclopedia of Food Safety. – 2013. – P. 433–441. – DOI:10.1016/b978-0-12-378612-8.00104-9.
61. Christensen, D.G. Genetic Manipulation of *Vibrio fischeri* / D.G. Christensen, J. Tepavčević, K.L. Visick // Current Protocols in Microbiology. – 2020. – Vol. 59, № 1. – P. 115. – DOI: 10.1002/cpmc.115.
62. Dafopoulou, K. Reply to «Reliability of Gradient Diffusion Methods for Detection of Acquired Colistin Resistance» / K. Dafopoulou, O. Zarkotou, E. Dimitroulia [et al.] // Antimicrob Agents Chemother. – 2016. – Vol. 60, № 7. – P. 4424–4425. – DOI: 10.1128/AAC.00206-16.

63. Dafale, N.A. Selection of appropriate analytical tools to determine the potency, microbial bioactivity and antibiotic resistances / N.A. Dafale, U.P. Semwal, R.K. Rajput, G.N. Singh // *Journal of Pharmaceutical Analysis*. – 2016. – Vol. 6, № 4. – P. 207–213. – DOI: 10.1016/j.jpha.2016.05.006.
64. Daoudi, Y. Effect of culture media on the agar diffusion method for testing antibacterial activity against *Escherichia coli* "HO25" / Y. Daoudi, S. Daoudi, S. Bennacer [et al.] // *Revue ElWahat pour les Recherches et les Etudes*. – 2017. – Vol. 10, № 2. – P. 157–165.
65. Deng, Z. Model of hormesis and its toxicity mechanism based on quorum sensing: a case study on the toxicity of sulfonamides to *Photobacterium phosphoreum* / Z. Deng, Z. Lin, X. Zou [et al.] // *Environ Sci Technol*. – 2012. – Vol. 46, № 14. – P. 7746–7754. – DOI: 10.1021/es203490f.
66. Desrosiers, M. Effectiveness of topical antibiotics on *Staphylococcus aureus* biofilm *in vitro* / M. Desrosiers, Z. Bendouah, J. Barbeau // *American Journal of Rhinology*. – 2007. – Vol. 21, № 2. – P. 149–153. – DOI: 10.2500/ajr.2007.21.3007.
67. Difco™ and BBL™ Manual: manual of microbiological culture media, 2nd edn. / M.J. Zimbro, D.A. Power, J.A. Johnson [et al.]. – Maryland: Becton Dickinson and Company, 2009. – P. 347–348.
68. Doherty, F.V. A Review of the Microtox ® Toxicity Test System for Assessing the Toxicity of Sediments and Soils / F.V. Doherty // *Water Quality Research Journal of Canada*. – 2001. – Vol. 36, № 3. – P. 475–518. – DOI: 10.2166/wqrj.2001.027.
69. Etebu, E. Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives / E. Etebu, I. Arikekpar // *International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research*. – 2016. – Vol. 4. – P. 90–101.
70. Farre, M. Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis / M. Farré, D. Barceló, // *Trends Anal. Chem.* – 2003. – Vol. 22. – P. 299–310. – DOI: 10.1016/S0165-9936(03)00504-1.

71. Fagade, O.E. Comparative Study of Antibiotic Resistance of *Staphylococcus* Species Isolated from Clinical and Environmental Samples / O.E. Fagade, C.O. Ezeamagu, A.A. Oyelade, A.A. Ogunjobi // AU Journal of Technology. – 2010. – Vol. 13, № 3. – P. 165–169.

72. Ferreira, G.L.S. Susceptibility of cariogenic microorganisms to phytoconstituents / G.L.S. Ferreira, L.M.D. Bezerra, I.L.A. Ribeiro [et al.] // Braz J Biol. – 2018. – Vol. 78, № 4. – P. 691–696. – DOI: 10.1590/1519-6984.174147.

73. Filimon, M.N. Testing the sensitivity of *Staphylococcus aureus* antibiotics / M.N. Filimon, A.B. Borozan, R. Popescu // Analele Universitatii din Oradea, Fascicula Biologie. TOM XVI. – 2009. – № 2. – P. 70–73.

74. Finberg, R.W. The importance of bactericidal drugs: Future directions in infectious disease / R.W. Finberg, R.C. Moellering, F.P. Tally // Clin Infect Dis. – 2004. – Vol. 39, № 9. – P. 1314–1320. – DOI: 10.1086/425009.

75. Furtado, G.L. Single-disk diffusion testing (Kirby-Bauer) of susceptibility of *Proteus mirabilis* to chloramphenicol: significance of the intermediate category / G.L. Furtado, A.A. Medeiros // J Clin Microbiol. – 1980. – Vol. 12, № 4. – P. 550–553. – DOI: 10.1128/jcm.12.4.550-553.1980.

76. Glupczynski, Y. *In vitro* activity of temocillin against prevalent extended-spectrum beta-lactamases producing *Enterobacteriaceae* from Belgian intensive care units / Y. Glupczynski, T.-D. Huang, C. Berhin [et al.] // Eur J Clin Microbiol Infect Dis. – 2007. – Vol. 26, № 11. – P. 777–783. – DOI: 10.1007/s10096-007-0370-9.

77. Goossens, H. Susceptibility of multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units: Results from the European MYSTIC study group / H. Goossens // Clinical microbiology and infection. – 2003. – Vol. 9, № 9. – P. 980–983. – DOI: 10.1046/j.1469-0691.2003.00690.x.

78. Hastings, J.W. Bacterial bioluminescence / J.W. Hastings, K.H. Nealson // Annu. Rev. Microbiol. – 1977. – Vol. 31. – P. 549–595.

79. Han, C.S. Pathogenomic sequence Analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Isolates Closely Related to *Bacillus anthracis* / C.S. Han, G.

Xie, J.F. Challacombe [et al.] // Journal of Bacteriology. – 2006. – Vol. 188, № 9. – P. 3382–3390. – DOI: 10.1128/JB.188.9.3382-3390.2006.

80. Hastings, J.W. Bioluminescence and Chemiluminescence / J.W. Hastings, C.H. Johnson // Methods Enzymol. – 2003. – Vol. 360. – P. 75–104.

81. Hombach, M. Standardisation of disk diffusion results for antibiotic susceptibility testing using the sirscan automated zone reader / M. Hombach, R. Zbinden, E.C. Böttger // BMC Microbiol. – 2013. – Vol. 13. – P. 225. – DOI: 10.1186/1471-2180-13-225.

82. Iqbal, M. Ofloxacin: laboratory evaluation of the antibacterial activity of 34 brands representing 31 manufacturers available in Pakistan / M. Iqbal, S. Hakimm, A. Hussain [et al.] // Pakistan Journal of Medical Sciences. – 2004. – Vol. 20. – P. 349-356.

83. Jawhara, S. *In vivo* imaging of bioluminescent *Escherichia coli* in a cutaneous wound infection model for evaluation of an antibiotic therapy / S. Jawhara, S. Mordon // Antimicrob Agents Chemother. – 2004. – Vol. 48, № 9. – P. 3436-3441. – DOI: 10.1128/AAC.48.9.3436-3441.2004.

84. Jeong, S.H. Broth microdilution method to detect extended-spectrum beta-lactamases and AmpC beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* isolates by use of clavulanic acid and boronic acid as inhibitors / S.H. Jeong, W. Song, J.-S. Kim, H.-S. Kim, K.M. Lee // J Clin Microbiol. – 2009. – Vol. 47, № 11. – P. 3409-3412. – DOI: 10.1128/JCM.01141-09.

85. Jia, K. Measurement of Bacterial Bioluminescence Intensity and Spectrum: Current Physical Techniques and Principles / K. Jia, R.E. Ionescu // Adv Biochem Eng Biotechnol. – 2016. – Vol. 154. – P. 19-45. – DOI: 10.1007/10_2015_324.

86. Johnson, B.T. Microtox® Acute Toxicity Test / B.T. Johnson // Small-scale Freshwater Toxicity Investigations. – P. 69-105.

87. Johnson, B.T. Microtox® Toxicity Test System – New Developments and Applications / B.T. Johnson // Microscale Testing in Aquatic Toxicology. – 2018. – P. 201-218. – DOI: 10.1201/9780203747193-14.

88. Jonasson, E. The EUCAST rapid disc diffusion method for antimicrobial susceptibility testing directly from positive blood culture bottles / E. Jonasson, E. Matuschek, G. Kahlmeter // *J Antimicrob Chemother.* – 2020. – Vol. 75, № 4. – P. 968-978. – DOI: 10.1093/jac/dkz548.
89. Jorgensen, J.H. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices / J.H. Jorgensen, M.J. Ferraro // *Clin Infect Dis.* – 2009. – Vol. 49, № 11. – P. 1749-1755. – DOI: 10.1086/647952.
90. Jung, Y. Design and application of a portable luminometer for bioluminescence detection / Y. Jung, C. Coronel-Aguilera, I.-J. Doh [et al.] // *Applied Optics.* – 2020. – Vol. 59, № 3. – P. 801-810. – DOI: 10.1364/AO.59.000801.
91. Kaiser, K.L. Correlations of *Vibrio fischeri* bacteria test data with bioassay data for other organisms / K.L. Kaiser // *Environ Health Perspect.* – 1998. – Vol. 106. – P. 583-591. – DOI: 10.1289/ehp.98106583.
92. Khan, Z.A. Current and Emerging Methods of Antibiotic Susceptibility Testing / Z.A. Khan, M.F. Siddiqui, S. Park // *Diagnostics (Basel).* – 2019. – Vol. 9, № 2. – P. 49. DOI: 10.3390/diagnostics9020049.
93. King, T. Comparative evaluation of methods commonly used to determine antimicrobial susceptibility to plant extracts and phenolic compounds / T. King, G. Dykes, R. Kristianti // *J AOAC Int.* – 2008. – Vol. 91, № 6. – P. 1423-1429.
94. Kirillova, M.A. Bioluminescent System of Luminous Bacteria for Detection of Microbial Contamination / M.A. Kirillova, E. Esimbekova, R. Ranjan [et al.] // *Journal of Siberian Federal University Biology.* – 2018. – Vol. 11, № 3. – P. 174-180. – DOI:10.17516/1997-1389-0060.
95. Kong, I.C. Application of the Recombinant Bioluminescence Bacterium on the Toxicity Assessment of the Sole Chemicals and Soil Samples / I.C. Kong, J.-Y. Kim, S.-H. Lee, K.-S. Ko // *Journal of Korean Society of Environmental Engineers.* – 2012. – Vol. 34, № 2. – P. 136-142. – DOI: 10.4491/KSEE.2012.34.2.136.

96. Kuznetsov, A.M. Analysis of river water by bioluminescent biotests / A.M. Kuznetsov, E.K. Rodicheva, S.E. Medvedeva // *Luminescence*. – 1999. – Vol. 14, № 5. – P. 263-265. – DOI: 10.1002/(SICI)1522-7243(199909/10)14:5<263::AID-BIO544>3.0.CO;2-Y.
97. Li, M. Acute toxicity evaluation for quinolone antibiotics and their chlorination disinfection processes / M. Li, D. Wei, Y. Du // *J Environ Sci (China)*. – 2014. – Vol. 26, № 9. – P. 1837-1842. – DOI: 10.1016/j.jes.2014.06.023.
98. Li, J. Antimicrobial Activity and Resistance: Influencing Factors / J. Li, S. Xie, S. Ahmed [et al.] // *Frontiers in Pharmacology*. – 2017. – Vol. 8. – P. 364. – DOI: 10.3389/fphar.2017.00364.
99. Li, Y. Bacterial bioluminescence assay for bioanalysis and bioimaging / Y. Li, X. He, W. Zhu [et al.] // *Anal Bioanal Chem*. – 2022. – Vol. 414, № 1. – P. 75-83. – DOI: 10.1007/s00216-021-03695-9.
100. Lorenzo, V.D. Recombinant bacteria for environmental release: what went wrong and what we have learnt from it / V.D. Lorenzo // *Clin Microbiol Infect*. – 2009. – Vol. 1. – P. 63-65. – DOI: 10.1111/j.1469-0691.2008.02683.x.
101. Lungu, N.C. Study of the Penicillin Dissipation in Aqueous Solution of Penicillinase with Attenuated Activity / N.C. Lungu, M. Alexandroaei, I. Sandu // *Revista de Chimie*. – 2013. – Vol. 62, № 8. – P. 787-791.
102. Martini, S. Quantification of bioluminescence from the surface to the deep sea demonstrates its predominance as an ecological trait / S. Martini, S.H.D. Haddock // *Sci Rep*. – 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 45750. – DOI: 10.1038/srep45750.
103. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Routine and extended internal quality control as recommended by EUCAST. Version 8.0. [Электронный ресурс]. – 2018. – URL: <http://www.eucast.org/> (дата обращения 20.04.2024).
104. Menz, J. Toxicity testing with luminescent bacteria--characterization of an automated method for the combined assessment of acute and chronic effects /

J. Menz, M. Schneider, K. Kümmerer // *Chemosphere*. – 2013. – Vol. 93, № 6. – P. 990-996. – DOI: 10.1016/j.chemosphere.2013.05.067.

105. Morsy, N. Color difference for shade determination with visual and instrumental methods: a systematic review and meta-analysis / N. Morsy, A.A. Holiel // *Syst Rev*. – 2023. – Vol. 12, № 1. – P. 95. DOI: 10.1186/s13643-023-02263-9.

106. Muneeswaran, T. Rapid assessment of heavy metal toxicity using bioluminescent bacteria *Photobacterium leiognathi* strain GoMGm1 / T. Muneeswaran, N. Kalyanaraman, T. Vennila [et al.] // *Environ Monit Assess*. – 2021. – Vol. 3, № 109. – P. 193. – DOI: 10.1007/s10661-021-08860-2.

107. Najjar, N.H.E. Levofloxacin oxidation by ozone and hydroxyl radicals: kinetic study, transformation products and toxicity / N.H.E. Nasma, A. Touffet, M. Deborde [et al.] // *Chemosphere*. – 2013. – Vol. 93, № 4. – P. 604-611. – DOI: 10.1016/j.chemosphere.2013.05.086.

108. Ncube, N.S. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: Current methods and future trends / N.S. Ncube, A.J. Afolayan, A.I. Okoh // *African Journal of Biotechnology*. – 2008. – Vol. 7, № 12. – P. 1797-1806. – DOI:10.4314/ajb.v7i12.58804.

109. Niemirycz, E. The Microtox® biological test: Application in toxicity evaluation of surface waters and sediments in Poland / E. Niemirycz, J. Nichthäuser, M. Staniszevska [et al.] // *Oceanological and Hydrobiological Studies*. – 2007. – Vol. 36, № 4. – P. 151-163. – DOI: 10.2478/v10009-007-0030-5.

110. Nijs, A. Comparison and evaluation of Osiris and Sirscan 2000 antimicrobial susceptibility systems in the clinical micro-biology laboratory / A. Nijs, R. Cartuyvels, A. Mewis [et al.] // *J. Clin. Microbiol*. – 2003. – Vol. 41. – P. 3627-3630. – DOI: 10.1128/JCM.41.8.3627-3630.2003.

111. Nikolić, D. The common nase (*Chondrostoma nasus*) as an indicator of aquatic pollution and human health risk assessment associated with its

consumption / D. Nikolić, S. Subotić, S. Skorić // Environ Sci Pollut Res Int. – 2024. – Vol. 31, № 1. – P. 1050-1063. – DOI: 10.1007/s11356-023-31018-1.

112. Oliveira, A. Antimicrobial activity and acute toxicity of ozonated lomefloxacin solution / A. Oliveira, M. Maniero, C. Rodrigues-Silva, J. Guimarães // Environ Sci Pollut Res Int. – 2017. – Vol. 24, № 7. – P. 6252-6260. – DOI: 10.1007/s11356-016-8319-0.

113. Ortlieb, N. Development of an agar-plug cultivation system for bioactivity assays of actinomycete strain collections / N. Ortlieb, E. Klenk, A. Kulik, T.H.J. Niedermeyer // PLoS One. – 2021. – Vol. 16, № 11. – P. 0258934. – DOI: 10.1371/journal.pone.0258934.

114. Orszulik, S.T. A simplified and accurate approach to agar diffusion antibiotic assay / S.T. Orszulik // Journal of Microbiological Methods. – 2022. – Vol. 200. – P. 106538. – DOI: 10.1016/j.mimet.2022.106538.

115. Othman, M. Optimal methods for evaluating antimicrobial activities from plant extracts / M. Othman, H.S. Loh, C. Wiart [et al.] // J Microbiol Methods. – 2011. – Vol. 84, № 2. – P. 161-166. – DOI: 10.1016/j.mimet.2010.11.008.

116. Özçelik, B. Evaluation of susceptibility testing by comparison of broth microdilution and disk agar diffusion tests in *Staphylococci* / B. Özçelik, F. Kaynak, U. Abbasoğlu // Turk J Pharm Sci. – 2004. – Vol. 1, № 2. – P. 77-86.

117. Park, S. Hazard assessment of commonly used agricultural antibiotics on aquatic ecosystems / S. Park, K. Choi // Ecotoxicology. – 2008. – Vol. 17, № 6. – P. 526-538. – DOI: 10.1007/s10646-008-0209-x.

118. Pal, M. Epidemiology, Pathogenicity, Animal Infections, Antibiotic Resistance, Public Health Significance, and Economic Impact of *Staphylococcus aureus*: A Comprehensive Review / M. Pal, G. Berhanu, L. Megersa, V. Kandi // American Journal of Public Health Research. – 2020. – Vol. 8, № 1. – P. 14-21. – DOI: 10.12691/ajphr-8-1-3.

119. Parvez, S. A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals / S.

Parvez, C. Venkataraman, S. Mukherji // Environment International. – 2006. – Vol. 32, № 2. – P. 265–268. – DOI: 10.1016/j.envint.2005.08.022.

120. Paul, S. I. Identification of marine sponge-associated bacteria of the Saint Martin's island of the Bay of Bengal emphasizing on the prevention of motile *Aeromonas septicemia* in *Labeo rohita* / S.I. Paul, M.M. Rahman, M.A. Salam [et al.] // Aquaculture. – 2021. – P. 545. – DOI:10.1016/j.aquaculture.2021.737156.

121. Pedahzur, R. Water toxicity detection by a panel of stress-responsive luminescent bacteria / R. Pedahzur, B. Polyak, R.S. Marks, S. Belkin // J Appl Toxicol. – 2004. – Vol. 24, № 5. – P. 343-348. – DOI: 10.1002/jat.1023.

122. Pfaller, M.A. Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods / M.A. Pfaller, D. Andes, D.J. Diekema [et al.] // Drug Resist Updat. – 2010. – Vol. 13, № 6. – P. 180-195. – DOI: 10.1016/j.drug.2010.09.002.

123. Perin, L.S. Bioluminescent Dinoflagellates as a Bioassay for Toxicity Assessment / L.S. Perin, G.V. Moraes, G.A. Galeazzo, A.G. Oliveira // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23, № 21. – P. 13012. – DOI: 10.3390/ijms232113012.

124. Piñeiro, L. Tratamiento antibiótico dirigido en infecciones por *Mycoplasma genitalium*: análisis de mutaciones asociadas con resistencia a macrólidos y fluoroquinolonas / L. Piñeiro, P. Idigoras, I.D.L. Caba [et al.] // Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. – 2019. – Vol. 37, № 6. – P. 394-397. – DOI: 10.1016/j.eimc.2018.10.003.

125. Popov, D. Unresolved issues of antibiotic therapy of infections caused by *Staphylococcus aureus* / D. Popov // Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. – 2020. – P. 189-195. – DOI: 10.36488/cmac.2020.3.189-195.

126. Rodríguez-Angeles, G. [Principal characteristics and diagnosis of the pathogenic groups of *Escherichia coli*] / G. Rodríguez-Angeles // Salud Publica Mex. – 2002. – Vol. 44, № 3. – P. 464-475.

127. Ren, S. The use of a genetically engineered pseudomonas species (Shk1) as a bioluminescent reporter for heavy metal toxicity screening in wastewater treatment plant influent / S. Ren, P.D. Frymier // Water Environ Res. – 2003. – Vol. 75, № 1. – P. 21-29. – DOI: 10.2175/106143003x140791.

128. Rodicheva, E.K. Bioluminescent Bioassays Based on Luminous Bacteria / E.K. Rodicheva, A.M. Kuznetsov, N.A. Tyulkova, S. Medvedeva // Journal of Siberian Federal University. Biology. – 2009. – Vol. 2, № 4. – 418-452. – DOI: 10.17516/1997-1389-0222.

129. Ruan, J. [Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (second edition) Volume 5 and the study of Actinomycetes systematic in China] / J. Ruan // Wei Sheng Wu Xue Bao. – 2013. – Vol. 53, № 6. – P. 521-530.

130. Salvador, J.-P. Application of bioassays/biosensors for the analysis of pharmaceuticals in environmental samples / J.-P. Salvador, J. Adrian, R. Galve [et al.] // Comprehensive Analytical Chemistry. – 2007. – Vol. 50. – P. 279-334. – DOI: 10.1016/S0166-526X(07)50009-7.

131. Shittu, A.O. Insights on Virulence and Antibiotic Resistance: A Review of the Accessory Genome of *Staphylococcus aureus* // A.O. Shittu, E. Udo, J. Lin // Wounds: a compendium of clinical research and practice. – 2007. – Vol. 19, № 9. – P. 237-244.

132. Simon, L. Luminescent method for the detection of antibacterial activities / L. Simon, C. Fremaux, Y. Cenatiempo, J.M. Berjeaud // Appl Microbiol Biotechnol. – 2001. – Vol. 57, № 5-6. – P. 757-763. – DOI: 10.1007/s00253-001-0833-3.

133. Smaill, F. Antibiotic susceptibility and resistance testing: an overview / F. Smaill // Can J Gastroenterol. – 2000. – Vol. 14, № 10. – P. 871-875. – DOI: 10.1155/2000/382415.

134. Su, Y. *Bacillus subtilis*: A universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine / Y. Su, C. Liu, H. Fang, D. Zhang // Microbial Cell Factories. – 2020. – Vol. 19, № 1. – P. 173. – DOI: 10.1186/s12934-020-01436-8.

135. Syal, K. Current and emerging techniques for antibiotic susceptibility tests / K. Syal, M. Mo, H. Yu [et al.] // *Theranostics*. – 2017. – Vol. 7, № 7. – 1795-1805. – DOI: 10.7150/thno.19217.
136. Tian, X.L. [Comparison of Epsilometer test and agar dilution method in detecting the sensitivity of *Helicobacter pylori* to metronidazole] / X.L. Tian, Z.Q. Song, B.J. Suo [et al.] // *Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. – 2023. – Vol. 55, № 5. – P. 934-938. – DOI: 10.19723/j.issn.1671-167X.2023.05.024.
137. Tsybul'skiĭ, I.E. [New biosensors for assessment of environmental toxicity based on marine luminescent bacteria] / I.E. Tsybul'skiĭ, M.A. Sazykina // *Prikl Biokhim Mikrobiol*. – 2010. – Vol. 46, № 5. – P. 552-557.
138. Turlej-Rogacka, A. Evaluation of colistin stability in agar and comparison of four methods for MIC testing of colistin / A. Turlej-Rogacka, B.B. Xavier, L. Janssens // *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. – 2018. – Vol. 37, № 2. – P. 345-353. – DOI: 10.1007/s10096-017-3140-3.
139. Ulitzur, S. A novel and sensitive test for rapid determination of water toxicity / S. Ulitzur, T. Lahav, N. Ulitzur // *Environ Toxicol*. – 2002. – Vol. 17, № 3. – P. 291-296. – DOI: 10.1002/tox.10060.
140. Wang, L. Rapid determination of the toxicity of quantum dots with luminous bacteria / L. Wang, H. Zheng, Y. Long [et al.] // *J Hazard Mater*. – 2010. – Vol. 177, № 1-3. – P. 1134-1137. – DOI: 10.1016/j.jhazmat.2009.12.001.
141. Wang, T. Insights into influencing factor, degradation mechanism and potential toxicity involved in aqueous ozonation of oxcarbazepine (CHEM₄₆₉₃₉R₁) / T. Wang, Z.-X. Huang, H.-F. Miao, W.-Q. Ruan // *Chemosphere*. – 2018. – Vol. 201. – P. 189-196. – DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.02.062.
142. Wang, W. Eco-toxicological bioassay of atmospheric fine particulate matter (PM_{2.5}) with *Photobacterium phosphoreum* T3 / W. Wang, C. Shi, Y. Yan [et al.] // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2016. – Vol. 133. – P. 226–234. – DOI: 10.1016/j.ecoenv.2016.07.024.
143. Wang, X. Influence of Antibiotic Pressure on Five Plasmid-based Bioluminescent Gram-negative Bacterial Strains / X. Wang, H. Chi, Q. Li [et al.] //

Mol Imaging Biol. – 2018. – Vol. 20, № 1. P. 21-26. – DOI: 10.1007/s11307-017-1110-x.

144. Wang, Y. Probiotic potential of *Lactobacillus* on the intestinal microflora against *Escherichia coli* induced mice model through high-throughput sequencing / Y. Wang, A. Li, L. Zhang // Microb Pathog. – 2019. – Vol. 137. – P. 103760. – DOI: 10.1016/j.micpath.2019.103760.

145. Waseem, M. Phytochemical profiling of antimicrobial and potential antioxidant plant: *Nepeta cataria* / M. Waseem // Front Plant Sci. – 2022. – Vol. 13. – P. 969316. – DOI: 10.3389/fpls.2022.969316.

146. Wu, H. Strategies for combating bacterial biofilm infections / H. Wu, C. Moser, H.-Z. Wang [et al.] // Int J Oral Sci. – 2015. – Vol. 7, № 1. – P. 1-7. – DOI: 10.1038/ijos.2014.65.

147. Yehia, M.R. Adaptation of a Bacterial Bioluminescent Assay to Monitor Bioeffects of Gold Nanoparticles / M.R. Yehia, T.E. Smolyarova, A.V. Shabanov // Bioengineering (Basel). – 2022. – Vol. 9, № 2. – P. 61. – DOI: 10.3390/bioengineering9020061.

148. Yue, W. Improved Design of Automatic Luminometer for Total Bacteria Number Detection Based on ATP Bioluminescence / W. Yue, C.-J. Bai // Journal of Food Safety. – 2013. – Vol. 33. – P. 1-7. – DOI: 10.1111/jfs.12016.

149. Zhang, Z. Luminescent sensors for residual antibiotics detection in food: Recent advances and perspectives / Z. Zhang, H. Zhang, D. Tian [et al.] // Coordination Chemistry Reviews. – 2024. – Vol. 498. – P. 215455. – DOI: 10.1016/j.ccr.2023.215455.

150. Zou, X. The joint effects of sulfonamides and their potentiator on *Photobacterium phosphoreum*: differences between the acute and chronic mixture toxicity mechanisms / X. Zou, Z. Lin, Z. Deng, D. Yin, Y. Zhang // Chemosphere. – 2012. – Vol. 86, № 1. – P. 30-35. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2011.08.046.