

## ОЦЕНКА ПРИМЕНИМОСТИ ПРИРОДНЫХ ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ АЗОВСКОГО И ЧЕРНОГО МОРЕЙ, ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ АНТИБИОТИКОВ

**С.Л. Сафронюк, В.В. Самолук, А.М. Милова, Ю.Ю. Гавриченко, А.М. Кацев**

Медицинская академия имени С.И. Георгиевского (структурное подразделение)  
Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования  
«Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», Симферополь

Для цитирования: Сафронюк С.Л., Самолук В.В., Милова А.М., Гавриченко Ю.Ю., Кацев А.М. Оценка применимости природных люминесцентных бактерий, выделенных из Азовского и Черного морей, для определения антимикробной активности антибиотиков // Аспирантский вестник Поволжья. – 2020. – № 5–6. – С. 175–183. DOI: <https://doi.org/10.17816/2072-2354.2020.20.3.175-183>

Поступила: 07.07.2020

Одобрена: 11.08.2020

Принята: 14.09.2020

■ В работе проведено исследование пяти изолятов светящихся бактерий, выделенных из гидробионтов Азовского и Черного морей. По результатам изучения морфо-культуральных и физиолого-биохимических свойств установили, что изоляты М1 и М4 являются представителями вида *Aliivibrio harveyi*, а изоляты Fb, Sh1 и В — представителями вида *Photobacterium leiognathi*. При изучении действия цинка сульфата на люминесцентной бактерии установили, что наиболее чувствительным оказался штамм *P. leiognathi* Sh1. Эффективная концентрация, снижающая биoluminesцентный индекс (БЛИ), на 50 % ( $ЭК_{50}$ ) для цинка сульфата при воздействии на тест-штамм составила  $4,0 \pm 0,1$  мкг/мл. На основании полученных экспериментальных данных штамм *P. leiognathi* Sh1 был выбран в качестве тест-объекта для определения антимикробной активности бензилпенициллина, гентамицина, стрептомицина, тетрациклина и цефтриаксона. По результатам оценки действия антибиотиков на тест-объект установили, что через 15 мин инкубации значения БЛИ снизились на 50 % в образцах, содержащих бензилпенициллин, гентамицин и тетрациклин.  $ЭК_{50}$  данных препаратов составили 500, 283,0 и 28,5 мкг/мл соответственно. При оценке 18-часового действия антибактериальных препаратов установили, что для тест-штамма при контакте со всеми антибактериальными агентами происходило снижение БЛИ на 100 % от контрольных значений. На основании проведенных исследований установили, что штамм *P. leiognathi* Sh1 может использоваться в качестве тест-объекта для определения антимикробной активности антибиотиков.

■ **Ключевые слова:** антибиотики; люминесцентные бактерии; *Photobacterium leiognathi*; *Aliivibrio harveyi*.

## ASSESSMENT OF THE APPLICABILITY OF PRIMARILY IDENTIFIED NATURAL LUMINESCENT BACTERIA, ISOLATED FROM THE AZOV AND THE BLACK SEAS, TO DETERMINE THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ANTIBIOTICS

**S.L. Safronyuk, V.V. Samolyuk, A.M. Milova, Yu.Yu. Havrichenko, A.M. Katsev**

Medical Academy named after S.I. Georgievsky of V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia

For citation: Safronyuk SL, Samolyuk VV, Milova AM, Havrichenko YuYu, Katsev AM. Assessment of the applicability of primarily identified natural luminescent bacteria, isolated from the Azov and the Black seas, to determine the antimicrobial activity of antibiotics. *Aspirantskiy Vestnik Povolzh'ya*. 2020;(5-6):175–183. DOI: <https://doi.org/10.17816/2072-2354.2020.20.3.175-183>

Received: 07.07.2020

Revised: 11.08.2020

Accepted: 14.09.2020

■ Five isolates of luminous bacteria from aquatic organisms of the Azov and the Black Seas were isolated. The study of morphological, cultural, physiological and biochemical properties showed that isolates M1 and M4 were the representatives of the species *A. harveyi*, and isolates Fb, Sh1, and B were the representatives of the species *P. leiognathi*. It was found that the strain *P. leiognathi* Sh1 was the most sensitive to zinc sulfate when studying its effect on allocated luminescent bacteria. The effective concentration that reduced the bioluminescent index (BLI) by 50% ( $EC_{50}$ ) for zinc sulfate, when exposed to the test strain, was  $4,0 \pm 0,1$  µg/ml. Experimental data allowed to consider the strain *P. leiognathi* Sh1 to be the test-object for determining the antimicrobial activity of benzylpenicillin, gentamicin, streptomycin,

tetracycline and ceftriaxone. The results of evaluating the effect of antibiotics on the test object, revealed that after 15 minutes of incubation, the BLI values decreased by 50% only in samples containing benzylpenicillin, gentamicin, and tetracycline. Their  $EC_{50}$  were 500.0, 283.0 and 28.5  $\mu\text{g/ml}$  respectively. It was found that the exposure of test-strain to all antibacterial agents demonstrated resulted in decrease in BLI by 100% as compared to the control values. Strain *P. leiognathi* Sh1 can be used as a test-object for determining the antimicrobial activity of antibiotics.

■ **Keywords:** antibiotics; luminescent bacteria; *Photobacterium leiognathi*; *Vibrio harveyi*.

## Введение

Биолюминесценция — одно из самых захватывающих и уникальных явлений живой природы. Способность живых организмов излучать видимый свет появилась в процессе эволюции [1]. Биолюминесценция широко распространена в морской среде, ее можно наблюдать у бактерий, беспозвоночных, рыб и пр. У бактерий данное явление проявляется в виде непрерывного свечения в присутствии кислорода при концентрации клеточек, превышающих кворум-чувствительный уровень [2]. Интенсивность люминесценции зависит от большого количества внешних факторов, в частности, температуры, pH, степени аэрации, гидростатического давления, состава среды, воздействующих на метаболизм клеток и в целом на их структуру. Светящиеся бактерии — это самые маленькие источники биолюминесценции, способные излучать  $10^3$ – $10^4$  квант/с · клетку [3–5]. Спектр эмиссии большинства люминесцентных бактерий характеризуется отдельной широкой полосой с пиком 490–495 нм. Благодаря таким особенностям биолюминесцентные бактерии являются перспективными тест-объектами в современных аналитических технологиях.

Высокая чувствительность и быстрая реакция на действие различных агентов делают биолюминесценцию бактерий эффективным инструментом для определения микроколичеств различных ингибиторов биологической активности [1]. В настоящее время, люминесцентные бактерии уже выступают во многих исследованиях в качестве биотестов, например, в токсикологии при мониторинге окружающей среды и в фармации для определения биологической активности и оценки антибиотических эффектов различных лекарственных препаратов [6–11]. Известно о различных биосенсорах на основе целых клеток, где в качестве биоматериала для сенсора применяют бактерии. Такой вид биосенсоров может предоставлять информацию, связанную с физиологией клеток, биологической и токсикологической активностью образца, что не позволяет определить биосенсоры на основе молекул.

В целом, бактериальное тестирование обладает рядом преимуществ: простота использования, высокая чувствительность, быстрота реакции, относительная стабильность при изменении температур, низкие материальные затраты [12].

**Цель исследования** — провести первичную идентификацию и оценить применимость люминесцентных изолятов, выделенных из акваторий Азовского и Черного морей, в качестве биотестов для определения антимикробной активности антибиотиков.

## Материалы и методы

В качестве объектов для выделения люминесцентных бактерий выступали гидробионты Азовского и Черного морей: европейский сарган (*Belone belone*), креветка обыкновенная (*Crangon crangon*), черноморская мидия (*Mytilus galloprovincialis*), каменный краб (*Eriphia verrucosa*), которые измельчали механическим путем. Образовавшиеся частицы, размером около 1 см<sup>3</sup>, помещали на поверхность плотных питательных сред (Nutrientagar, HiMedia M001, India) с 3 % натрия хлоридом (НПФ «Невский химик», Россия). Полученные системы термостатировали при 25 °С в термостате (ТСО-1/80 СПУ, Россия). Наблюдения за ростом посева проводили в темной комнате, через каждый час, до выявления сияющих зон в сине-зеленой области видимого спектра. Очистку светящихся микроорганизмов осуществляли с применением стандартных микробиологических методов [13]. Выделение чистых колоний люминесцентных изолятов проводили на основании однородности цвета, формы и размеров колоний, а также интенсивности их свечения.

Первичную идентификацию изолятов проводили по морфологическим и физиолого-биохимическим признакам. Морфологические признаки оценивали макроскопическими и микроскопическими методами. При этом изучали размер, цвет, форму, консистенцию, характер поверхности колоний, подвижность и окраску клеток по методу Грама, а также интенсивность их свечения.

Физиологические характеристики, такие как люминесценция, определяли, культивируя

изоляты при 4, 25 и 37 °C в 1 мл жидкой питательной среды (Nutrientbroth, HiMedia M001, Индия), содержащей 3 % хлорида натрия, в течение 24 ч. Интенсивность люминесценции ( $I$ ) измеряли на портативном люминометре Lumishot<sup>+</sup> (ООО «НПП «Прикладные биосистемы», Красноярск, Россия).

Определение бактериальной цитохром-оксидазы проводили при помощи готового коммерческого теста MICROLATEST Oxitest (Erba Lachema s.r.o., Чехия). Каталазную активность изолятов оценивали путем нанесения на чистую колонию, культивированную в течение суток, раствора 3 % перекиси водорода (ЮжФарм, Россия). Способность бактерий ферментировать различные субстраты, такие как глицерин, маннит, сахарозу, D-(+)-глюкозу, D-(+)-мальтозу, D-(+)-маннозу, D-(+)-лактозу (AppliChem, Германия) проводили с использованием рядов Гисса, где в качестве индикатора выступал бромтимоловый синий (АО «ЛенРеактив», Россия). Методика проведения исследований и интерпретации результатов описана в работе [14].

В качестве дополнительного параметра, при идентификации выделенных изолятов, использовали тип кинетики люциферазной реакции, характерный дифференциальный признак люминесцентных бактерий [15, 16]. Для этого проводили накопление биомассы клеток изолятов путем их культивирования в жидкой питательной среде в течение 24 ч. Полученную через сутки суспензию, центрифугировали в течение 15 мин при 3000 об/мин с применением высокоскоростной центрифуги (Microspin-12, Biosan, Латвия). Далее удаляли супернатант, а осадок суспендировали с 5 мл натрий-фосфатного буфера с pH  $7,2 \pm 0,1$ . После этого проводили разрушение клеток на ультразвуковом дезинтеграторе (Ultrasonic disintegrator, type UD-11, automatic, Techpan, Польша) и получали ферментный препарат, содержащий люциферазу выделенных изолятов. Оценку активности люциферазы проводили путем регистрации изменения светового сигнала системы, состоящей из 440 мкл натрий-фосфатного буфера с нейтральным значением pH, 10 мкл 0,1 % водно-спиртового раствора додеканаля (Fluka, Швейцария), 50 мкл полученного ферментного препарата и 500 мкл фотовосстановленного флавиномононуклеотида (AppliChem, Германия), в кювете люминометра LumiShot<sup>+</sup> [17].

Кинетические характеристики реакции окисления восстановленного флавиномононуклеотида при участии длинноцепочечного альдегида и полученных ферментных препара-

тов оценивали по константе скорости полужатухания люциферазной реакции ( $K_{LR}$ ) (1).

$$K_{LR} = (\ln(I_{\max}) - \ln(I_{1/2})) / (T_{\max} - T_{1/2}), \quad (1)$$

где  $I_{\max}$  — максимальное значение интенсивности люминесценции,  $I_{1/2}$  — снижение интенсивности люминесценции в 2 раза от максимального ее значения,  $T_{\max}$  — время достижения максимального значения интенсивности люминесценции,  $T_{1/2}$  — время достижения снижения интенсивности люминесценции в 2 раза.

Выбор наиболее перспективного штамма для дальнейших исследований проводили по оценке их чувствительности к цинку сернокислому (АО «ЛенРеактив», Россия). Изучение действия цинка сульфата на тест-объекты проводили по методике ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.11-04. Для этого готовили исходный раствор, содержащий 0,175 мг/мл цинка сернокислого в дистиллированной воде. После, в кювету люминометра вносили от 850 до 899 мкл 3 % натрия хлорида, 50 мкл натрий-фосфатного буфера и от 1 до 50 мкл исходного раствора сульфата цинка. Далее систему выдерживали, в течение 15 мин при постоянном перемешивании, для оптимального распределения всех компонентов смеси. Затем вносили по 50 мкл бактериальной суспензии с концентрацией  $1 \cdot 10^7$  клеток/мл. Контрольный образец состоял из тех же компонентов, кроме раствора сульфата цинка, который заменили соответствующими объемами 3 % натрия хлорида. Результаты измерений выражали в виде биолюминесцентного индекса (БЛИ) в процентах, рассчитанного по формуле (2) [15]:

$$\text{БЛИ} = I_o / I_k \cdot 100 \%, \quad (2)$$

где  $I_o$  — интенсивность люминесценции образца, содержащего антибиотик,  $I_k$  — интенсивность люминесценции контрольного образца.

Изучение применимости отобранного тест-штамма люминесцентных бактерий для определения антимикробной активности антибиотиков определяли путем оценки его чувствительности к бензилпенициллину (порошок для приготовления раствора для инъекций, ОАО «Киевмедпрепарат», Украина), гентамицину (раствор для инъекций, 40 мг/мл, ООО «Фармацевтическая компания «Здоровье», Украина), стрептомицину (порошок для приготовления раствора для инъекций, ОАО «Киевмедпрепарат», Украина), тетрациклину (порошок для приготовления раствора для инъекций, ЗАО «Агрофарм Научно-производственное предприятие», Россия) и цефтриаксону (порошок для приготовления раствора для инъекций, «Алембик Лимитед»,

Таблица 1 / Table 1

Данные о выделенных изолятах бактерий  
Data on isolated bacterial isolates

Кодировка штамма	Объект и место выделения	Размер колоний, мм
Fb	<i>Belone belone</i> , Черное море	1
Sh1	<i>Crangon crangon</i> , Азовское море	1,3
M1	<i>Mytilus galloprovincialis</i> , Черное море	2
M4	<i>Mytilus galloprovincialis</i> , Черное море	0,5
B	<i>Eriphia verrucosa</i> , Азовское море	0,7

Индия). Изучение действия антибиотиков на тест-объекты проводили по модифицированной методике ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.11-04. Для этого в кювету люминометра вносили 3 % раствор хлорида натрия в объеме от 750 до 845 мкл, 50 мкл натрий-фосфатного буфера ( $\text{pH} = 7,2 \pm 0,1$ ), 50 мкл жидкой питательной среды и от 5 до 100 мкл раствора антибиотика. Препараты бензилпенициллина, стрептомицина, тетрациклина гидрохлорида и цефтриаксона заранее разводили в дистиллированной воде для приготовления раствора с концентрацией 10 мг/мл. Гентамицин вносили без предварительного разведения дистиллированной водой. После чего полученную систему перемешивали на орбитальном шейкере OS-20 (Biosan, Латвия) в течение 10 мин. Затем к системе добавляли по 50 мкл бактериальной суспензии, которую готовили путем разведения ночной культуры 3 % раствором натрия хлорида до концентрации  $1 \cdot 10^7$  клеток/мл. Контрольный образец состоял из тех же компонентов, кроме растворов антибиотиков, которые заменили соответствующими объемами 3 % натрия хлорида. В качестве положительного контроля, ответственного за подтверждение нормального функционирования тест-объекта, выступала система, содержащая вместо антибиотика — цинк сернокислый 7-водный. Регистрацию светового потока проводили с применением биохемилюминометра БХЛ-06 (Нижний Новгород, Россия). Значение БЛИ рассчитывали по формуле (2).

Действие антибактериальных препаратов на люминесценцию бактерий оценивали путем определения эффективной концентрации антибиотика, снижающей БЛИ на 50 % ( $\text{ЭК}_{50}$ ) через 15 мин и через 18 ч инкубации.

Обработка данных проводилась с помощью программы Microsoft Excel.

## Результаты и обсуждение

В результате полевых испытаний, из акваторий Азовского и Черного морей, удалось выделить пять изолятов со стабильным свече-

нием, которым присвоили кодовые названия (табл. 1).

В результате изучения морфологических свойств изолятов, установили, что их колонии характеризуются круглой формой, белым цветом, слизистой консистенцией, гладкой и выпуклой поверхностью с ровными краями. Изоляты M4 и B, в отличие от остальных выделенных бактерий, образовывали более мелкие (точечные) колонии с диаметром 0,5–0,7 мм (табл. 1) [18].

Микроскопия препаратов «висячая капля» показала, что все изоляты являются подвижными палочками. Изучение фиксированных мазков, окрашенных по Граму, позволило определить их принадлежность к грамотрицательным бактериям.

На основании критериев дифференцировки микроорганизмов семейства *Vibrionaceae*, удалось исключить принадлежность изолятов к видам *Aliivibriofischeri*, *Aliivibriologei* и *Photobacterium phosphoreum*, поскольку ни один из них не светился при  $+4^\circ\text{C}$  и не обладал желтым пигментом [19].

По результатам изучения биохимических свойств, которые представлены в табл. 2, установили, что только изолят M1 характеризовался наличием каталазной активности. Оксидазную активность проявляли изоляты M1 и M4. Изолят M1 ферментировал все субстраты, кроме сахарозы и D-(+)-лактозы, а M4 не ферментировал только D-(+)-лактозу. Изолят B окислял четыре субстрата — глицерин, D-(+)-глюкозу, D-(+)-мальтозу и D-(+)-маннозу. Fb ферментировал три субстрата — глицерин, D-(+)-глюкозу и D-(+)-маннозу, а Sh1 — два сахара — D-(+)-глюкозу и D-(+)-маннозу.

Оценка активности ферментативных препаратов, содержащих люциферазу показала, что изоляты M1 и M4 имели медленный тип ферментативной кинетики с  $K_{LR}$  равными 0,06 и 0,03  $\text{с}^{-1}$  соответственно. Изоляты B, Fb и Sh1 обладали быстрым типом люциферазной кинетики с константами 0,34, 0,55 и 0,53  $\text{с}^{-1}$  соответственно, результаты представлены в табл. 2 и на рис. 1.



Таблица 2 / Table 2

**Физиологические и биохимические характеристики люминесцентных изолятов**  
**Physiological and biochemical characteristics of luminescent isolates**

Штамм		Fb	Sh1	M1	M4	B
Каталазная активность		–	–	+	–	–
Оксидазная активность		–	–	+	+	–
Глицерин		+	–	+	+	+
Маннит		–	–	+	+	–
Сахароза		–	–	–	+	–
D-(+)-глюкоза		+	+	+	+	+
D-(+)-мальтоза		–	–	+	+	+
D-(+)-манноза		+	+	+	+	+
D-(+)-лактоза		–	–	–	–	–
Свечение при	4 °C	–	–	–	–	–
	25 °C	+	+	+	+	+
	37 °C	–	–	–	–	–
Интенсивность люминесценции (I) клеток, RLU		$6,2 \cdot 10^4$	$1,1 \cdot 10^6$	$5,7 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^6$
Скорость полужатухания люциферазной реакции ( $K_{LR}$ ), $c^{-1}$		$0,55 \pm 0,03$	$0,53 \pm 0,05$	$0,06 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,01$	$0,34 \pm 0,03$

Примечание. «+» — наличие признака или ферментов, окисляющих субстрат; «–» — отсутствие признака или ферментов, позволяющих окислять субстрат.

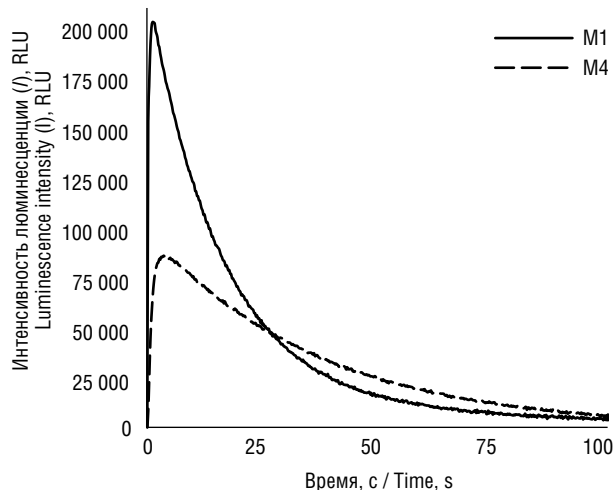
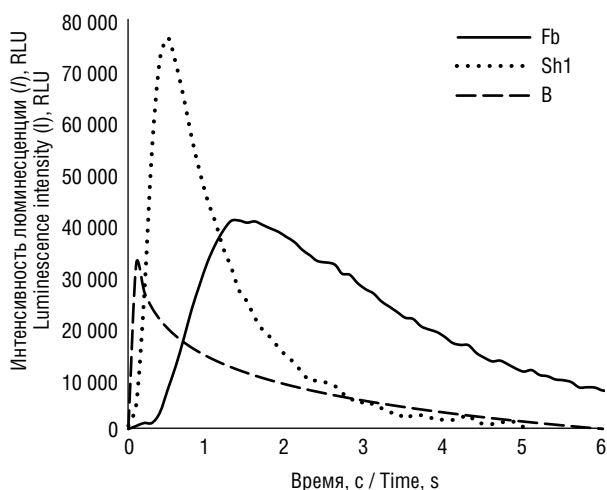
Note. “+” presence of the feature or the enzyme which oxidize the substrate; “–” lack of the feature or the enzyme which oxidize the substrate.

Анализируя все полученные данные, была определена видовая принадлежность каждого изученного изолята. Так, M1 и M4 отнесли к виду *Vibrio harveyi*, а штаммы Fb, Sh1 и B — к виду *Photobacterium leiognathi*.

На следующем этапе работы, для оценки чувствительности люминесцентных бактерий к ингибиторам биологической активности, использовали водный раствор сульфата цинка в качестве стандартного токсического агента.

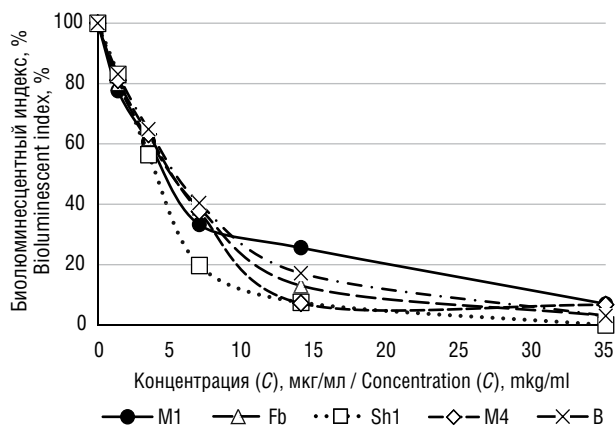
Результаты проведенных исследований представлены на рис. 2.

При расчете эффективных концентраций цинка сульфата, снижающих интенсивность свечения исследуемых тест-объектов на 50 %, установили, что ЭК<sub>50</sub> для штамма *V. harveyi* M1 составила  $4,58 \pm 0,1$  мкг/мл, *P. leiognathi* Fb —  $5,0 \pm 0,3$  мкг/мл, *P. leiognathi* Sh1 —  $4,0 \pm 0,1$  мкг/мл, *V. harveyi* M4 —  $5,1 \pm 0,2$  мкг/мл и *P. leiognathi* B —  $5,3 \pm 0,2$  мкг/мл (рис. 2).



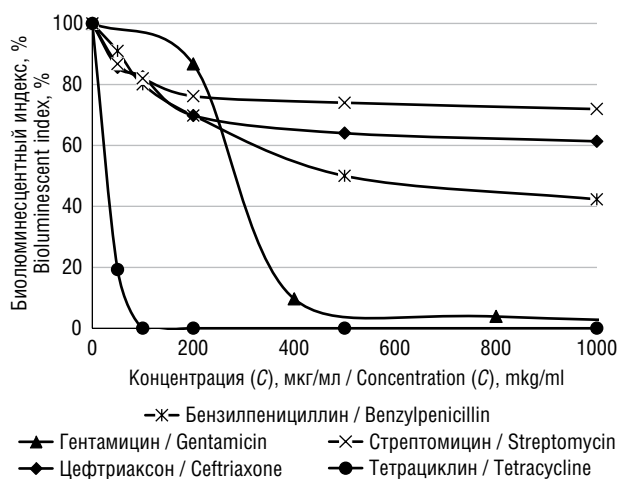
**Рис. 1.** Кинетика люциферазной реакции выделенных изолятов

**Fig. 1.** Kinetics of the luciferase reaction of isolates



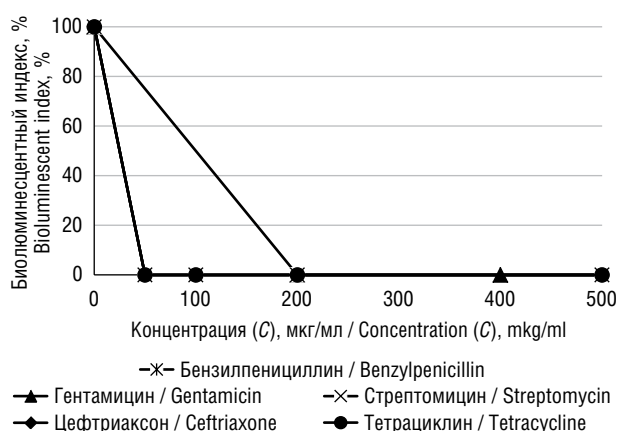
**Рис. 2.** Влияние различных концентраций цинка сульфата на люминесценцию природных светящихся бактерий

**Fig. 2.** The effect of various concentrations of zinc sulfate on the luminescence of natural luminous bacteria



**Рис. 3.** Действие растворов антибиотиков на тест-штамм *P. leiognathi* Sh1 через 15 мин инкубации

**Fig. 3.** The effect of antibiotic solutions on the test-strain *P. leiognathi* Sh1 after 15 minutes of incubation



**Рис. 4.** Действие растворов антибиотиков на тест-штамм *P. leiognathi* Sh1 через 18 ч инкубации

**Fig. 4.** The effect of antibiotic solutions on the test strain *P. leiognathid* Sh1 after 18 hours of incubation

Таким образом, из пяти изучаемых тест-объектов наиболее чувствительными оказались бактерии штамма *P. leiognathi* Sh1, это также подтверждают проведенные ранее исследования [10]. На основании вышеизложенных данных, оценку антибактериальных свойств лекарственных препаратов из группы антибиотиков проводили с использованием тест-штамма *P. leiognathi* Sh1.

В результате исследования действия растворов антибиотиков на *P. leiognathi* Sh1 через 15 мин установили, что ЭК<sub>50</sub> для бензилпенициллина, гентамицина и тетрациклина составили 500, 283,0 и 28,5 мкг/мл соответственно (рис. 3). Для стрептомицина и цефтриаксона, за данный промежуток времени ЭК<sub>50</sub> установить не удалось, поскольку они вызывали снижение биолуминесценции на 28,08 и 38,65 % соответственно, при концентрации антибиотика в пробе равной 1000 мкг/мл. В свою очередь, полученные результаты находят свое подтверждение в ранее проведенных исследованиях по оценке влияния антибиотиков на светящиеся бактерии [20].

Полученные результаты могут быть опосредованно или напрямую связаны с механизмом действия антибиотиков. Так, бензилпенициллин и цефтриаксон нарушают синтез пептидогликанов клеточной стенки и вызывает лизис микроорганизмов, что проявлялось в виде снижения БЛИ не более чем на 57,69 и 38,65 % соответственно через 15 мин биотестирования [21]. Гентамицин связывается с 30S субъединицей рибосом и нарушает синтез белка, а в больших концентрациях способен нарушать барьерную функцию цитоплазматической мембраны клетки, что сопровождалось снижением БЛИ на 96,15 % [21]. Снижение интенсивности биолуминесценции на 100 % при действии тетрациклина на тест-штамм может быть обусловлено механизмом действия, связанным с нарушением образования комплекса между транспортной РНК и рибосомой, что приводит к нарушению синтеза белка, а также высокой токсичностью препарата [21, 22].

Механизм действия стрептомицина заключается в том, что антибиотик проникает внутрь микробной клетки и нарушает образование иницирующего комплекса между матричной РНК и 30S субъединицей рибосомы [21]. В данном исследовании, при действии стрептомицина на бактериальную клетку, наблюдалось снижение значений БЛИ на 28,08 % от контрольных значений.

Затем провели оценку действия выбранных антибиотиков через 18 ч инкубации с тест-штаммом, поскольку такой подход обладает

более высокой чувствительностью к биологическим эффектам исследуемых веществ [15]. В результате исследования действия растворов антибиотиков на *P. leiognathi* Sh1 через 18 ч установили, что все антибиотики снижали значения БЛИ на 100 % контрольных значений, данные представлены на рис. 4.

Таким образом, результаты исследований показывают чувствительность штамма *P. leiognathi* Sh1 к антибактериальным веществам, что проявляется в виде снижения БЛИ для тест-штамма при контакте со всеми антибактериальными агентами как через 15 мин, так и через 18 ч.

Учитывая низкие действующие концентрации антибиотиков, описанные в Государственной фармакопее РФ XIV издания [23], точные значения  $ЭК_{50}$  рассчитать не удалось. Однако при сравнении аппроксимированных значений  $ЭК_{50}$  для данных антибактериальных субстанций через 18 ч и их  $ЭК_{50}$  через 15 мин установили, что для бензилпенициллина, гентамицина, тетрациклина, стрептомицина и цефтриаксона произошло снижение  $ЭК_{50}$  от 2 до 40 раз.

В свою очередь, результаты проведенных исследований показывают чувствительность штамма *P. leiognathi* Sh1 к антибактериальным веществам, что проявляется в виде снижения БЛИ для тест-штамма при контакте со всеми антибактериальными агентами как через 15 мин, так и через 18 ч.

По результатам проведенных исследований показано, что морские природные биoluminesцентные бактерии идентифицированного штамма *P. leiognathi* Sh1 чувствительны к действию антибактериальных веществ и могут быть использованы в качестве биосенсора для оценки антимикробных свойств лекарственных препаратов, содержащих антибиотики.

## Выводы

Из гидробионтов Азовского и Черного морей было выделено пять люминесцентных изолятов бактерий. По результатам оценки морфо-культуральных и биохимических свойств изолятов их удалось дифференцировать следующим образом: изоляты М1 и М4 были первично идентифицированы как представители вида *V. harveyi*, а Fb, Sh1 и B — представители вида *P. leiognathi*.

По результатам оценки чувствительности первично идентифицированных штаммов люминесцентных бактерий к действию цинка сульфата установили, что минимальное значение  $ЭК_{50} = 4,0 \pm 0,1$  мкг/мл позволяет

определить тест-штамм *P. leiognathi* Sh1 как наиболее чувствительный к действию «эталонного» токсиканта — цинка серноокислого. Полученные значения и анализ литературных данных позволили выбрать данный штамм в качестве тест-объекта для определения антимикробной активности антибиотиков.

При оценке действия антибиотиков на выбранный тест-штамм через 15 мин установили, что  $ЭК_{50}$  для бензилпенициллина, гентамицина и тетрациклина составили 500, 283,0 и 28,5 мкг/мл, соответственно. А через 18 ч установили, что все антибактериальные препараты, при данных концентрациях, снижали значения БЛИ на 100 %.

Полученные данные способствуют расширению знаний в области бактериальной биoluminesценции и возможности использования природных светящихся бактерий в качестве тест-объектов при проведении биологических анализов лекарственных препаратов.

**Финансирование.** Исследование выполнено в рамках поддержанного программой развития ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского» гранта № ВГ19/2018 и проекта № И/2018/16.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Литература

1. Medvedeva SE, Tyulkova NA, Kuznetsov AM, Rodicheva EK. Bioluminescent bioassays based on luminous bacteria. *Journal of Siberian Federal University*. 2009;2(4):418–452.
2. Zarubin M, Belkin S, Ionescu M, Genin A. Bacterial bioluminescence as a lure for marine zooplankton and fish. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(3):853–857. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116683109>.
3. Baumann P, Baumann L, Bang SS, Woolkalis MJ. Reevaluation of the taxonomy of *Vibrio*, *Beneckea* and *Photobacterium*: abolition of the genus *Beneckea*. *Curr Microbiol*. 1980;4(3):127–132. <https://doi.org/10.1007/BF02602814>.
4. Baumann P, Baumann L. The marine gram-negative eubacteria: Genera *Photobacterium*, *Beneckea*, *Alteromonas*, *Pseudomonas* and *Alcaligenes*. In The procarotes. Berlin: Springer; 1981;1302–1331.
5. Baumann P, Baumann L, Woolkalis MJ, Bang SS. Evolutionary relationships in *Vibrio* and *Photobacterium*. A basis for a natural classification. *Annu Rev Microbiol*. 1983;37:363–398. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.37.100183.002101>.
6. Futra D, Heng LY, Surif S, et al. Microencapsulated *Aliivibrio fischeri* in alginate microspheres for monitoring heavy metal toxicity in environmental waters. *Sen-*

- sors (Basel). 2014;14(12):23248–23268. <https://doi.org/10.3390/s141223248>.
7. Jarque S, Masner P, Klánová J, et al. Bioluminescent *Vibrio fischeri* assays in the assessment of seasonal and spatial patterns in toxicity of contaminated river sediments. *Front Microbiol.* 2016;7:1738. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01738>.
8. Kurvet I, Juganson K, Vija H, et al. Toxicity of nine (Doped) rare earth metal oxides and respective individual metals to aquatic microorganisms *Vibrio fischeri* and *Tetrahymena thermophila*. *Materials (Basel).* 2017;10(7):754. <https://doi.org/10.3390/ma10070754>.
9. Shao Y, Wu LL, Gao HW, Wang F. Effect of soluble sulfide on the activity of luminescent bacteria. *Molecules.* 2012;17(5):6046–6055. <https://doi.org/10.3390/molecules17056046>.
10. Сафронюк С.Л., Гавриченко Ю.Ю., Кацев А.М. Использование биолюминесцентных бактерий для оценки антибиотических эффектов лекарственных препаратов // Вестник ВГУ, серия: Химия. Биология. Фармация. – 2018. – № 1. – С. 194–203. [Safronyuk SL, Gavrichenko YuYu, Katsev AM. Applying of the bioluminescent bacteria for estimation of antibiotic effects of medicinal preparations. *Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy.* 2018;(1):194–203. (In Russ.)]
11. Wang D, Gu Y, Zheng M, et al. Mechanism-based QSTR model for acute to chronic toxicity extrapolation: A case study of antibiotics on luminous bacteria. *Scientific Reports.* 2017;7:6022. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06384-9>.
12. Gui Q, Lawson T, Shan S, et al. The application of whole cell-based biosensors for use in environmental analysis and in medical diagnostics. *Sensors (Basel).* 2017;17(7):1623. <https://doi.org/10.3390/s17071623>.
13. Зверев В.В. Микробиология, вирусология. Руководство к практическим занятиям / под ред. В.В. Зверева, М.Н. Бойченко. – М.: Геотар-Медиа, 2017. [Zverev VV. Mikrobiologiya, virusologiya. Rukovodstvo k prakticheskim zanyatiyam. Ed. by V.V. Zverev, M.N. Bojchenko. Moscow: Geotar-Media; 2017. (In Russ.)]
14. Сафронюк С.Л., Шарипов Э.Т., Кацев А.М. Идентификация светящихся бактерий, выделенных из акватории Черного и Азовского морей // Аспирантский вестник Поволжья. – 2017. – № 5-6. – С. 19–23. [Safronyuk SL, Sharipov ET, Katsev AM. Identification of luminous bacteria isolated from the Black and the Azov seas. *Aspirantskiy vestnik Povolzh'ya.* 2017;(5-6):19–23. (In Russ.)]
15. Дерябин Д.Г. Бактериальная биолюминесценция: фундаментальные и прикладные аспекты. – Новосибирск: Наука, 2009. [Deryabin DG. Bakterial'naya biolyuminescenciya: fundamental'nye i prikladnye aspekty. Novosibirsk: Nauka; 2009. (In Russ.)]
16. Makemson JC, Fulayfil NR, Landry W, et al. *Shewanella woodyi* sp. nov., an exclusively respiratory luminous bacterium isolated from the Alboran Sea. *Int J Syst Bacteriol.* 1997;47(4):1034–1039. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.11.6938-6942.2003>.
17. Кацев А.М. Ферментативная активность светящихся бактерий Черного и Азовского морей и их антиоксидантная защита // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. – 2014. – Т. 27(66). – № 3. – С. 184–193. [Katsev AM. Enzyme activity of bioluminescent bacteria from Black and Azov seas and their antioxidant defense. *Uchenye zapiski Tavricheskogo nacional'nogo universiteta imeni V.I. Vernadskogo. Seriya: biologiya, himiya.* 2014;27(3):184–193. (In Russ.)]
18. Концевая И.И. Микробиология: культивирование и рост бактерий. Практическое руководство для студ. биологич. спец. вузов. – Чернигов: Десна-Полиграф, 2017. [Koncevaya II. Microbiology: the cultivation and growth of bacteria. A practical guide for students of biological specialized universities. Chernigov: Desna Poligraf; 2017. (In Russ.)]
19. Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology. Volume Two: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria. Ed. by G. Garrity. Springer US; 2005. <https://doi.org/10.1007/0-387-28022-7>.
20. Jiang L, Lin Z, Hu X, Yin D. Toxicity prediction of antibiotics on luminescent bacteria, *Photobacterium phosphoreum*, based on their quantitative structure-activity relationship models. *Bull Environ Contam Toxicol.* 2010;85(6):550–555. <https://doi.org/10.1007/s00128-010-0157-z>.
21. Регистр лекарственных средств России: Энциклопедия лекарств. – Москва, РЛС, 2009. [Registr lekarstvennykh sredstv Rossii: Enciklopediya lekarstv. – Moscow: RLS; 2009. (In Russ.)]
22. Long S, Yang Y, Pavlostathis SG, et al. Toxicity of tetracycline and its transformation products to a phosphorus removing *Shewanella* strain. *Chemosphere.* 2020;246:125681. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125681>.
23. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. – М., 2018. – Т. 1. [Gosudarstvennaya farmakopeya Rossijskoj Federacii. XIV izdanie. Moscow; 2018. Vol. 1. (In Russ.)]

#### ■ Информация об авторах

Сергей Леонидович Сафронюк — старший преподаватель кафедры медицинской и фармацевтической химии. Медицинская академия имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского», Симферополь. E-mail: pharmlab01@mail.ru.

#### ■ Information about the authors

Sergey L. Safronyuk — Senior Lecturer, Department of Medical and Pharmaceutical Chemistry. Medical Academy named after S.I. Georgievsky of Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia. E-mail: pharmlab01@mail.ru.



## ■ Информация об авторах

*Влада Владимировна Самолук* — аспирант кафедры медицинской и фармацевтической химии. Медицинская академия имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского», Симферополь.  
E-mail: vlada.samolyuk.98@mail.ru.

*Алена Михайловна Милова* — студентка 3-го курса 2-го медицинского факультета. Медицинская академия имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского», Симферополь.  
E-mail: MilovaAM21@gmail.com.

*Юлия Юрьевна Гавриченко* — ассистент кафедры медицинской и фармацевтической химии. Медицинская академия имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского», Симферополь.  
E-mail: shkered.jolie@gmail.com.

*Андрей Моисеевич Кацев* — доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой медицинской и фармацевтической химии. Медицинская академия имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского», Симферополь.  
E-mail: katsev@mail.ru.

## ■ Information about the authors

*Vlada V. Samolyuk* — Postgraduate student, Department of Medical and Pharmaceutical Chemistry. Medical Academy named after S.I. Georgievsky of Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia.  
E-mail: vlada.samolyuk.98@mail.ru.

*Alena M. Milova* — 3<sup>rd</sup> year student of the 2<sup>nd</sup> Medical Faculty. Medical Academy named after S.I. Georgievsky of Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia.  
E-mail: MilovaAM21@gmail.com.

*Yuliia Yu. Havrichenko* — Assistant of the Department of Medical and Pharmaceutical Chemistry. Medical Academy named after S.I. Georgievsky of Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia.  
E-mail: shkered.jolie@gmail.com.

*Andrey M. Katsev* — Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Department of Medical and Pharmaceutical Chemistry. Medical Academy named after S.I. Georgievsky of Vernadsky Crimean Federal University, , Simferopol, Russia.  
E-mail: katsev@mail.ru.