

ОБЗОР ПОДХОДОВ К ОПРЕДЕЛЕНИЮ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ ПРИРОДНЫХ И СИНТЕТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ*

Т.В. Полюдова, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*

М.В. Антипьева, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*

А.Н. Лобанов, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*

Д.В. Ерошенко, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН,*

Институт технической химии УрО РАН

Для цитирования:

Полюдова Т.В., Антипьева М.В., Лобанов А.Н., Ерошенко Д.В. Обзор подходов к определению антибактериальной активности новых природных и синтетических соединений // Вестник Пермского федерального исследовательского центра. – 2025. – № 4. – С. 36–48. <https://doi.org/10.7242/2658-705X/2025.4.3>

Высокий интерес к исследованию и разработке новых антимикробных препаратов из различных источников обусловлен стремительно возрастающей угрозой микробной резистентности. В связи с этим все больше внимания уделяется методам скрининга и оценки антимикробной активности. Некоторые виды тестирования, такие как диско-диффузионный метод, метод диффузии в лунках агара и разведение в бульоне, хорошо известны и широко используются. Однако способы оценки действия на биопленки, выявление и пути ингибирования покоящихся форм не получили широкого распространения. Такие методы, как проточная цитофлуорометрия, флуоресцентные и биолюминесцентные методы, позволяют быстро получить результаты оценки действия антимикробных соединений и понять их влияние на жизнеспособность и повреждение клеток, однако требуют специального оборудования и дальнейшей оценки воспроизводимости и стандартизации. В данной статье представлен обзор комплекса методов определения чувствительности бактерий, которые используются для анализа новых соединений с антибактериальным потенциалом. В работе представлены широко известные, а также разработанные в лаборатории методы детекции антибактериальной активности. К ним относятся способы выявления штаммов-антагонистов, продуцирующих антимикробные соединения, количественная оценка антибактериальной активности, выявление покоящихся форм бактерий, ингибирование адгезии бактерий на твердой поверхности, действие антибактериальных соединений на формирование биопленок и на зрелые биопленки, изучение механизма действия, а также усиление антимикробных свойств.

* Работа выполнена в рамках государственного задания № 124020500028-4 «Биоразнообразие микроорганизмов антропогенно загрязненных экосистем и функционально-генетические механизмы их адаптации к стрессовым условиям окружающей среды».

Ключевые слова: антибактериальная активность, антибактериальные соединения, биопленки, индикаторные штаммы, минимальная ингибирующая концентрация, покоящиеся формы.

Актуальность

Перманентный мониторинг распространения антибиотикорезистентных микроорганизмов в популяциях человека и животных убедительно демонстрирует колоссальный успех бактерий и микромицетов в адаптации к антибиотическим лекарственным средствам [1]. Несмотря на постоянный поиск новых антимикробных средств, интенсивность их разработки и внедрения существенно уступает скорости приобретения микроорганизмами резистентности к подобным соединениям. Вместе с тем источники эффективных противомикробных соединений давно известны. Как правило, антибиотики – это природные соединения, выделяемые самими бактериями и грибами с целью подавления ближайшего конкурентного окружения [2, 3]. Вещества со специфической антимикробной активностью известны у представителей всех царств и отделов живой природы. С завидной регулярностью происходит выделение бактерий-продуцентов антибиотических соединений, поскольку они являются более удобными объектами для поиска и выделения биологически активных веществ [4, 5]. Многие из этих соединений хорошо изучены и применяются в практической деятельности человека [6, 7].

Кроме того, во всем мире огромное количество новых перспективных соединений создаётся путем химического синтеза [8, 9]. Значительная часть таких синтезированных веществ еще не получила широкого признания из-за ограниченного объема знаний об их биоактивном потенциале. Вещества, обладающие высокой антибактериальной активностью в сочетании с практической применимостью, встречаются относительно редко. Большинство антибиотиков разрабатывается

на основе существующих и известных молекулярных структур, функциональная активность которых усиливается за счет модификации периферических групп [10]. Тем не менее, возникновение резистентности у современных бактерий требует поиска новых соединений с принципиально новыми химическими структурами.

Важнейшим этапом поиска и создания новых антимикробных веществ является выявление их активности с подбором тест-штамма и определением спектра чувствительных микроорганизмов. Выявление антибактериальной активности (АБА) новых соединений возможно различными способами, которые позволяют установить характер их действия (бактериостатический или бактерицидный), минимальные ингибирующие концентрации, стимулирование образования покоящихся форм или их уничтожение, ингибирование прорастания спор и формирование биопленок, а также постантибиотический эффект [11].

Целью работы явился обзор методов детекции АБА различных соединений, разработанных в Лаборатории биохимии развития микроорганизмов «ИЭГМ УрО РАН».

Выбор индикаторных штаммов

Многие антимикробные соединения могут проявлять активность достаточно быстро, вызывая нарушение физической целостности клеточной мембраны и/или проникая в цитоплазму бактерий и воздействуя на внутриклеточные мишени. Общеизвестным является то, что взаимодействие с мембраной является ключевым фактором прямой антимикробной активности, как в случае воздействия на саму мембрану, так и в случаях внутриклеточных мишеней [12]. Электростати-

ческие и гидрофобные силы между молекулами антимикробных соединений и поверхностью бактерий являются критическими детерминантами этого взаимодействия. Поскольку бактерии делятся на две группы (грамположительные и грамотрицательные) на основе различий в структуре клеточной стенки, целесообразно при тестировании новых соединений использовать представителей обеих групп. В качестве индикаторных штаммов для оценки активности новых соединений чаще всего используют референсный штамм грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* ATCC 25922, грамположительных – *Staphylococcus* spp. Поскольку группа стафилококков делится на коагулазопозитивные (КПС) и коагулазонегативные виды (КНС), тестирование проводится на штаммах КНС *Staphylococcus epidermidis* ATCC 29887 и *S. epidermidis* ATCC 12228 и КПС *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Для выявления потенциала противотуберкулезной активности новых соединений в качестве тест-бактерий также используется модельный организм *Mycobacterium smegmatis*, родственный патогенным бактериям *Mycobacterium tuberculosis*, которые обладают особыми свойствами клеточной стенки. Пептидогликан бактерий рода *Mycobacterium* ковалентно связан с арабиногалактаном, концы которого этерифицированы миколовыми кислотами, образующими внутренний слой внешней мембраны микобактерий, известный как микомембрана. Микомембрана определяет физические и химические свойства поверхности клеток и придаёт им выраженную гидрофобность [13]. Соединения, обладающие гидрофобной природой, могут иметь высокое сродство с микомембранами и обладать противотуберкулезным потенциалом [14, 15].

Для детекции АБА при поиске бактериоцинов в лаборатории охарактеризован штамм *Staphylococcus cohnii* ВКМ-3165,

являющийся высокочувствительным к катионным пептидам. Высокая чувствительность к бактериоцинам стафилококков и лактококков, а также другим антибактериальным пептидам катионной природы, подтверждена экспериментальным путем. Кроме того, анализ генома *S. cohnii* ВКМ-3165 показал, что в нем не содержатся гены вирулентности и устойчивости к антибиотикам и антибактериальным пептидам, а также отсутствует ген множественной пептидной устойчивости (*mprF*). Полная последовательность генома штамма *S. cohnii* ВКМ-3165 депонирована в базу данных NCBI под номером GCA_050171255.1. Выявленные свойства *S. cohnii* ВКМ-3165 позволяют рекомендовать его в качестве безопасного индикаторного штамма для выявления антибактериальной активности катионных пептидных соединений, в том числе бактериоцинов.

Способы выявления штаммов-антагонистов, продуцирующих антимикробные соединения

Микроорганизмы, обладающие способностью синтезировать специфические факторы антагонизма, постоянно присутствуют в окружающей нас среде. Простым и наглядным методом скрининга микробов-антагонистов является метод перпендикулярных штрихов [16], который позволяет оценить спектр микроорганизмов, чувствительных к синтезируемому продуктом соединению. Пример такого способа детекции приведён на рис. 1. При расшифровке результатов теста сделан вывод о выраженной антагонистической активности *Staphylococcus warneri* KL-1 в отношении грамположительных бактерий (*Enterococcus faecalis* NCIMB 13280, *Listeria innocua* M-2, *Lactococcus lactis* NCDO763, *M. smegmatis* mc² 155, *M. smegmatis* ГИСК 167, *S. cohnii* ВКМ-3165, *S. epidermidis* ATCC 12228). Ранее

нами было показано, что *S. warneri* KL-1 является продуцентом катионного пептида варнерина (AP 02801 <https://aps.unmc.edu/database/peptide>) [17].

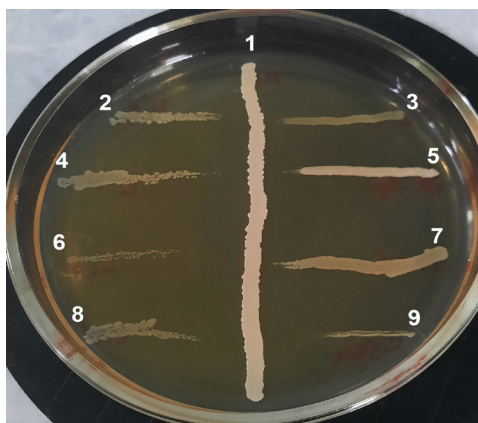


Рис. 1. Антагонистическая активность *S. warneri* KL-1 (1) в отношении бактерий *E. faecalis* NCIMB 13280 (2), *L. innocua* M-2 (3), *S. epidermidis* ATCC 12228 (4), *L. lactis* NCDO-763 (5), *M. smegmatis* mc² 155 (6), *E. coli* ATCC 25922 (7), *M. smegmatis* ГИСК 167 (8), *S. cohnii* ВКМ-3165 (9), выявленная методом перпендикулярных штрихов.

Быстрым и наглядным способом выявления антибактериальной активности в растворах является метод, основанный на диффузии вещества в плотную питательную среду. В качестве уплотнителя питательной среды нами используется агароза (0,8%), а в качестве питательной основы – среда Мюллера-Хинтона (МН), рекомендованная Институтом клинических и лабораторных стандартов (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) США) для тестирования антибактериальной активности [18]. Использование агарозы вместо агара позволяет получить менее плотную гелевую пластинку, в которой создаются благоприятные условия для развития предварительно иммобилизованных в неё тест-бактерий. Диффузия исследуемого соединения, стерильные аликвоты которого наносятся поверх агарозной пластинки, происходит более равномерно, поскольку агароза в водной сре-

де образует гель с большими порами, размер которых определяется ее концентрацией. Структура геля такова, что позволяет биологическим молекулам беспрепятственно и равномерно диффундировать в гелевом слое [19]. Зоны подавления роста микроорганизмов в местах аппликации растворов, содержащих антибактериальные факторы, выявляются после периода инкубации (24-48 ч) при оптимальной для тест-бактерий температуре (рис. 2).

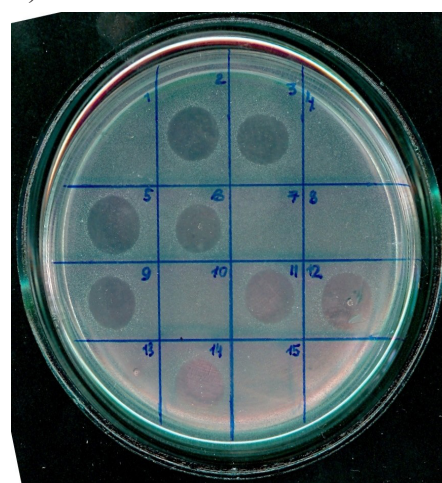


Рис. 2. Детекция АБА стерильных сред культивирования бактерий разных штаммов КНС. В качестве тест-бактерий использовали *S. cohnii* ВКМ-3165. Антибактериальная активность выявлена в образцах 2, 3, 5, 6, 9, 11, 12 и 14.

Данный метод может служить простым, экономичным и удобным инструментом для выявления антагонистической активности в бесклеточных средах роста бактерий – потенциальных продуцентов антибактериальных соединений и в растворах веществ с потенциальной антибактериальной активностью.

Количественная оценка антибактериальной активности

Для количественной оценки антибактериального действия общепринятым и рекомендованным CLSI является метод двукратных разведений исследуемого пре-

парата в жидкой питательной среде МН, а для бактерий с особыми потребностями к факторам роста используют специальные среды [18]. Так, для оценки чувствительности представителей микобактерий (модельный организм *M. smegmatis*) к антибактериальным соединениям использовали среду Middlebrook 7Н9 или Middlebrook 7Н11 для метода двукратных разведений в агаре [20].

Для визуализации роста индикаторных бактерий по окончании инкубационного периода при постановке теста двукратных микроразведений в стерильных 96-луночных планшетах используются соли тетразолия. Способность солей тетразолия восстанавливаться под действием фермен-

тов дыхательной цепи бактериальной клетки с образованием окрашенного продукта – формазана – позволяет выявить метаболически активные клетки аэробных бактерий [21]. В то же время соли тетразолия не подходят для детекции роста бактерий в анаэробных условиях и выявления покоящихся форм.

Использование раствора 2,3,5-трифенил-тетразолия хлористого позволяет окрасить метаболически активные клетки в красный цвет (рис. 3). Более чувствительной солью тетразолия является тиазолил синий тетразолий бромид (thiazolyl blue tetrazolium bromide; МТТ), окрашивающий метаболически активные клетки в синий цвет.

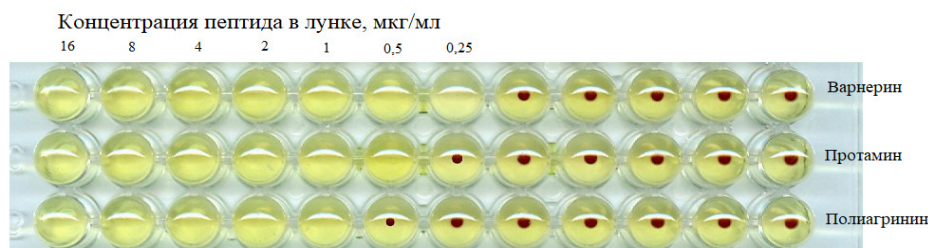


Рис. 3. Визуализация результатов тестирования АБА антимикробных пептидов методом двукратных микроразведений. Живые тест-бактерии *S. cohnii* ВКМ-3165 окрашены 2,3,5-трифенил-тетразолием хлористым

Метод двукратных разведений позволяет установить минимальную ингибирующую (подавляющую) рост бактерий концентрацию (МИК или МПК) исследуемых соединений при условии, что известна исходная концентрация тестируемого вещества (табл. 1). За МИК принимают наименьшую концентрацию исследуемого соединения, при которой не наблюдается рост тестовых микроорганизмов.

Таблица 1.

Значения МИК антимикробных пептидов для тест-бактерий *S. cohnii* ВКМ-3165

Пептид	МИК, мкг/мл
Варнерин	0,25
Протамина	0,5
Поли-L-аргинин	1

Данные таблицы свидетельствуют о том, что антимикробные пептиды по эффективности ингибирования бактерий *S. cohnii* ВКМ-3165 не уступают действию некоторых клинически значимых антибиотиков [22].

В случае, когда невозможно установить точную концентрацию действующего вещества, например, содержание бактериоцинов в культуральных жидкостях (секретах) бактериоциногенных штаммов, количественную характеристику антибактериальной активности выражают в условных единицах активности (ЕА). Условная ЕА равна обратной величине максимального разведения, при котором не обнаружен видимый рост индикаторных бактерий [23].

Минимальные бактерицидные концентрации соединений могут быть определены методом «Flash Microbiocide», который подразумевает перенос аликвот из лунок планшета с тестом на МИК в другой планшет со свежей питательной средой [24]. Результаты данного метода соответствуют референтным методам, описанным в документе M26-A Национального комитета по клиническим лабораторным стандартам (NCCLS-CLSI) [18].

Метод разведений в агаре рекомендован для оценки чувствительности микобактерий к антибиотикам, а также для исследования чувствительности бактерий к отдельным антибиотикам, например, фосфомицину [20, 22]. Кроме того, данный метод применяется для выявления фунгицидной активности соединений [25]. Метод разведения в агаре включает введение желаемых концентраций антимикробного агента в расплавленную агаровую среду, обычно с использованием последовательных двукратных разведений. После засты-

вания среды производят посев определенного микробного инокулята на поверхность агаровой пластины. Формирование колоний на агаре в количестве менее 0,1% от количества колониеобразующих единиц (КОЕ), нанесенных на поверхность агара с инокулятом, интерпретируется как МИК. Определение МИК, подавляющей развитие 99,9% бактерий в инокуляте ($МИК_{99}$), и минимальной бактерицидной концентрации (МБК) методом разведения в агаре позволяет оценить степень гетерогенности бактериальных культур и выявить наличие антибиотикорезистентных клеток в пределах популяции, чувствительной к антибиотику. $МИК_{99}$ рассматривалась как минимальная концентрация, ингибирующая рост 99,9% клеток, при которой возможен рост нитевидных структур или единичных колоний (рис. 4).

Как правило, значения $МПК_{99}$ и МБК, полученные методом разведения в агаре, превышают таковые, полученные методом разведения в бульоне [20].

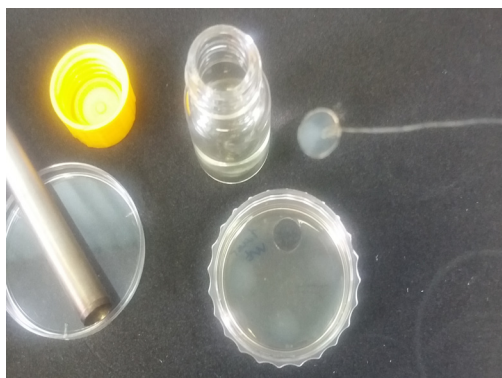


Рис. 4. Пример определения чувствительности *M. smegmatis mc² 155* к изониазиду методом разведения в агаре Middlebrook 7H11: $МИК_{99}$ – 4 мкг/мл, МБК – 16 мкг/мл.

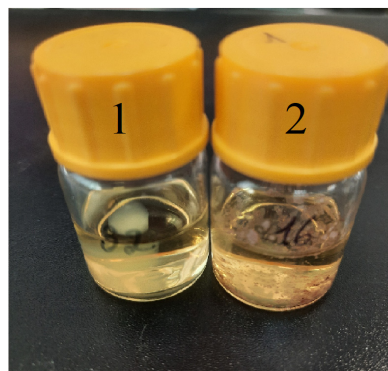
Выявление покоящихся форм бактерий

Известно, что популяции бактерий могут содержать персистирующие и покоящиеся формы, которые не формируют колоний на плотных питательных средах, оставаясь при этом резистентными к действию антимикробного агента [26]. Бактериальные эндоспоры также могут сохранять жизнеспособность в средах, содержащих антибактериальные соединения, но при этом не формируют колонии. Для выявления покоящихся форм на поверхности агара, содер-

жащего антибактериальное соединение, где не регистрируется формирование колоний, нами предложен метод культивирования агаровых блоков [27]. С этой целью из агаровой пластинки без видимого роста бактерий асептически вырезается фрагмент в месте нанесения инокулята, который переносится в стерильную жидкую питательную среду и культивируется при оптимальной температуре не менее 5 суток. Для визуализации роста в среду может быть добавлен стерильный раствор тетразолия (0,05 мг/мл) (рис. 5).



А



Б

Рис. 5. Перенос фрагмента агара ($0,022 \text{ см}^3$), содержащего антибиотик без видимого роста, в жидкую питательную среду (3 мл) (А) и результаты культивирования агаровых блоков в течение 5 суток (Б): 1 – отсутствие роста *M. smegmatis* mc^2 155 после культивирования агарового блока, содержащего 32 мкг/мл изониазида; 2 – рост бактерий *M. smegmatis* mc^2 155 через 5 суток культивирования агарового блока, содержащего 16 мкг/мл изониазида

Проведенные исследования констатируют, что отсутствие роста на поверхности агаризованной среды не всегда означает бактерицидную активность, а предложенный нами способ позволяет выявить бактерии, находящиеся в покое в состоянии в присутствии антибиотика.

Ингибирование адгезии бактерий на твердой поверхности, формирования биопленок и действие антибактериальных соединений на зрелые биопленки

Изучение новых соединений с выраженной антибактериальной активностью может быть продолжено применительно к бактериальным биопленкам. Биопленка представляет собой сложную структуру, состоящую из микробных сообществ или агрегатов клеток одного или нескольких видов. Формирование и развитие биопленки включает четыре стадии: обратимая агрегация, необратимая адгезия, развитие и созревание биопленки, старение биопленки и рассеяние бактерий с последующим распространением на другие поверхности [28]. В соответствии с этапами образования биопленок изучают возмож-

ные способы их подавления. Один и тот же антимикробный агент может проявлять свою биологическую активность на разных стадиях развития биопленки. На примере антибактериальных пептидов показано интенсивное ингибирование бактериальной адгезии как чувствительных к пептидам бактерий, так и резистентных к ним. Предполагается, что пептиды изменяют поверхностный заряд и гидрофобность как бактерий, так и атакуемых ими поверхностей [29]. У чувствительных бактерий некоторые соединения нарушают целостность мембраны [17], что также может влиять на начальные этапы адгезии. Бактериальная адгезия и формирование биопленок на разных типах твердых поверхностей могут быть количественно оценены с помощью косвенных методов (окрашивание кристаллическим фиолетовым, солями тетразолия, флуоресцентными красителями или люминесценции АТФ). Прямое наблюдение действия антимикробных соединений на формирующуюся биопленку можно проводить с использованием различных современных методов микроскопии, например, атомно-силовой (рис. 6).

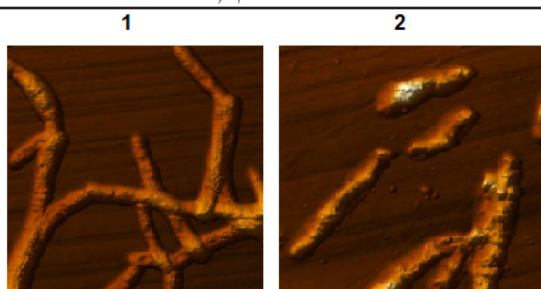


Рис. 6. Бактерии *M. smegmatis mc² 155* на поверхности полистирола через 24 ч инкубации в питательной среде (1) и в питательной среде с варнерином (2) (Атомно-силовая микроскопия, ACM Nano DST, Pacific Nanotechnology, USA)

Последующие стадии развития биопленки также могут быть ингибированы некоторыми антимикробными соединениями. Для изучения их действия на зрелую биопленку необходимо предварительно вырастить тест-бактерии в виде биопленки, на которую после отмывания нанести

раствор исследуемого соединения. По истечении периода инкубации биопленку вновь отмывают и оценивают общую биомассу, количество жизнеспособных клеток, а также архитектуру биопленки с помощью макроскопических методов (рис. 7).

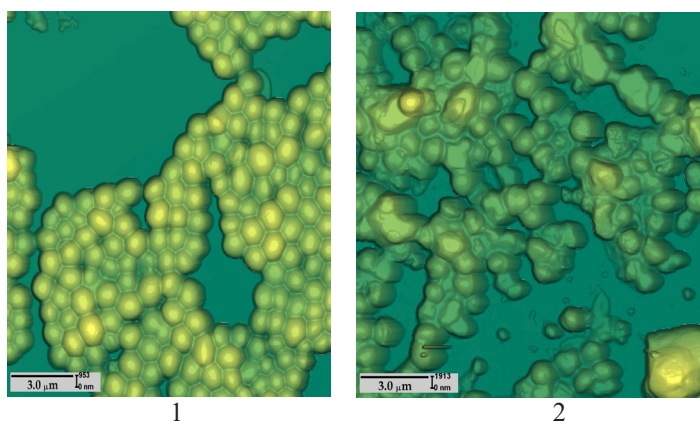


Рис. 7. Суточная биопленка *S. cohnii* BKM-3165 через 1 ч обработки 10 мМ Трис-НСl буфером (1) и буфером с варнерином (2) (Атомно-силовая микроскопия, ACM Nano DST, Pacific Nanotechnology, USA)

Полученные результаты сравнивают с контрольным образцом биопленки, с которым проводят аналогичные манипуляции, но без исследуемого соединения. Разрушение зрелых биопленок чувствительных бактерий после их обработки эффективными соединениями сопровождается не только снижением общей биомассы, но и бактерицидной активностью [30].

Изучение механизма действия антибактериальных соединений

Понимание механизма действия биологически активных соединений является основным требованием для открытия и

разработки новых лекарственных средств. Антибактериальные свойства новых соединений могут быть реализованы через различные и многообразные механизмы действия, которые важно установить. Антибактериальное действие может быть обусловлено генерированием свободных радикалов, нарушением синтеза пептидогликана и деления клеток [31], ингибированием синтеза ДНК и белка [32]. Эффекты соединений могут быть реализованы на уровне нарушения проницаемости мембран, активации лизиса, как в результате действия самого соединения, так и посредством активации аутолизина ата-

куемых бактерий [17]. Выводы о нарушении проницаемости мембран могут быть сделаны на основании обнаружения ионов калия или молекул АТФ в среде инкубации бактерий с исследуемым соединением [17]. Использование анализа биолюминесценции АТФ позволяет оценить уровень АТФ в тест-бактериях или в среде инкубации. Анализ биолюминесценции имеет широкий спектр применения, в том числе для оценки антибактериального действия [33]. Более масштабные нарушения мембраны атакованных клеток способствуют выходу макромолекул, таких как ДНК и РНК, которые можно обнаружить в среде с использованием спектрофотометрических или флуоресцентных методов. Активация лизиса бактерий-мишеней под действием исследуемых соединений может быть обнаружена по изменению мутности бактериальной суспензии, а также с помощью энзимогаммы аутолизисов бактерий. С этой целью полученные лизаты тест-бактерий отделяют от клеточных компонентов и подвергают ренатурируемому электрофорезу в полиакриламидном геле, содержащем убитые кипячением тест-бактерии или клетки *Micrococcus luteus*. После проявления энзимогамм регистрируют прозрачные зоны лизиса на фоне окрашенных иммобилизованных в гель клеток [34].

Так, при анализе лизатов *S. cohnii* ВКМ-3165, полученных под действием антимикробного пептида варнерина и детергента тритона X-100, показано электрофоретическое разделение белков, обладающих пептидогликангидролазной активностью. Наибольшее разнообразие аутолизисов было обнаружено в лизате, полученном при действии варнерина (рис. 8).

Для выяснения механизмов АБА также используют метод построения кривых «время–убийство» (time-kill), который является наиболее подходящим методом определения бактерицидного или фунги-

цидного эффекта. Он представляет собой мощный инструмент для получения информации о динамическом взаимодействии между антимикробным агентом и штаммом бактерий [35].

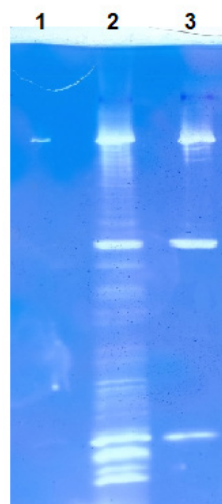


Рис. 8. Энзимогамма литических ферментов, обнаруженных в среде *S. cohnii* ВКМ-3165 через 1 ч инкубации в 10 мМ Трис-НСl буфере (1), в буфере в присутствии варнерина (2) и в буфере с 0,1 % тритоном X-100 (3)

Проточная цитометрия также может быть использована для тестирования восприимчивости микроорганизмов [36]. Быстрое обнаружение поврежденных клеток с помощью этого подхода зависит от использования соответствующих красителей.

Таким образом, при наличии соответствующей материально-технической базы можно оценить механизмы антибактериального действия соединений на примере наиболее чувствительного штамма.

Усиление антимикробных свойств новых соединений

При выявлении антимикробной активности в линейке новых соединений обычно выбирают вещества-лидеры, для которых показаны наиболее низкие значения МИК, сопоставимые со значениями клинически значимых антибиотиков. Однако антибактериальные эффекты соединений, действу-

ющих при более высоких концентрациях, могут быть значительно усилены применением адьювантных веществ. Так, антибактериальные эффекты лантибиотиков варнерина, хоминина и низина на грамотрицательные бактерии реализуются в присутствии субингибиторных количеств антибиотиков полимиксинового ряда [37], а также в гиперосмотических условиях [38].

Синергия между антимикробными препаратами основана на принципах повышения эффективности, снижения токсичности, увеличения биодоступности. Комбинированные антимикробные препараты на основе новых природных и синтетических соединений являются приоритетным направлением исследований [39]. Для изучения синергии соединений используют разные методы *in vitro*. Основным методом является анализ «шахматной доски» с последующим изоболограммным анализом [40] и анализом дозовых матриц [41].

Для повышения эффективности антибактериальных соединений необходимо изучить способы, которые улучшают их диффузию и нарушают мембранный барьер, отвечающий за общую устойчивость бактерий. Усиление антимикробного действия соединений может быть

потенцировано физическими воздействиями, такими как температура, ультразвук, различные диапазоны света [42, 43].

Заключение

В связи с растущей проблемой устойчивости к антибиотикам остро стоит вопрос поиска новых антибактериальных соединений. С этой целью скрининг огромного количества природных и синтетических соединений является первоочередной задачей. Важно понимать, что структура потенциального антимикробного агента определяет его функцию. Размер молекулы, состав заместителей или аминокислотных остатков в пептидах, заряд, конформация, спиральность, гидрофобность и амфифильность определяют антимикробную активность. Однако научная проблема «какая структура обуславливает биологическую активность» всё ещё требует постоянного изучения.

В заключение следует отметить, что данный обзор отразил лишь незначительную долю известных методов исследования антимикробной активности. В то же время результаты, получаемые с применением указанных подходов, могут способствовать решению глобальной проблемы устойчивости к антибиотикам.

Библиографический список

1. Cedeno-Munoz J.S., Aransiola S.A., Reddy K.V., Ranjit P., Victor-Ekwebelem M.O., Oyedele O.J., Perez-Almeida I.B., Maddela N.R., Rodriguez-Diaz J.M. Antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes as contaminants of emerging concern: Occurrences, impacts, mitigations and future guidelines // *Sci Total Environ*. 2024. – Vol. 20. – № 952. doi: 10.1016/j.scitotenv.2024.175906.
2. Reuben R.C., Torres C. Bacteriocins: potentials and prospects in health and agrifood systems // *Arch Microbiol*. – 2024. – Vol. 206. – № 5. – P. 233. doi: 10.1007/s00203-024-03948-y.
3. Durand G.A., Raoult D., Dubourg G. Antibiotic discovery: history, methods and perspectives // *Int J Antimicrob Agents*. – 2019. – Vol. 53. – № 4. – P. 371-382. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2018.11.010
4. Полодова Т.В., Лемкина Л.М., Антипова М.В., Есаев А.Л., Коробов В.П. Распространенность феномена продукции пептидных факторов антагонизма среди коагулазонегативных стафилококков // *Микробиология*. – 2024. – Т. 93. – № 6. – С. 797-806. – doi: 10.31857/S0026365624060109.
5. Hourigan D., Miceli de Farias F., O'Connor P.M., Hill C., Ross R.P. Discovery and synthesis of leaderless bacteriocins from the Actinomycetota // *J Bacteriol*. – 2024. – Vol. 206. – № 11. doi: 10.1128/jb.00298-24.
6. Field D., Fernandez de Ullivarri M., Ross R.P., Hill C. After a century of nisin research - where are we now? // *FEMS Microbiol Rev*. – 2023. – Vol. 47. – № 3. doi: 10.1093/femsre/fuad023.

7. Kowalczyk P., Kaczynska K., Kleczkowska P., Bukowska-Osko I., Kramkowski K., Sulejczak D. The Lactoferrin Phenomenon-A Miracle Molecule // *Molecules*. – 2022. – Vol. 27. – № 9. – P. 2941. doi: 10.3390/molecules2709294.
8. Юнникова Л.П., Акентьева Т.А., Суворова Ю.В., Данилова Е.А., Исляйкин М.К. Тропилированные 2-аминопиримидины. Особенности строения и биологическая активность // *Известия высших учебных заведений. Серия: Химия и химическая технология*. – 2022. – Т. 65. – № 7. – С. 35-44. doi: 10.6060/ivkkt.20226507.6562.
9. Frolov N.A., Seferyan M.A., Valeev A.B., Saverina E.A., Detusheva E.V., Vereshchagin A.N. The antimicrobial and antibiofilm potential of new water-soluble Tris-quaternary ammonium compounds // *Int J Mol Sci*. – 2023 – Vol. 24. – № 13. – P. 10512. doi: 10.3390/ijms241310512.
10. Fischbach M.A., Walsh C.T. Antibiotics for emerging pathogens // *Science* –2009. – Vol. 325. – № 5944. – P. 1089-1093. doi:10.1126/science.1176667.
11. Zarrini G., Delgosha Z.B., Moghaddam K.M., Shahverdi A.R. Post-antibacterial effect of thymol // *Pharmaceutical Biology* – 2010. – Vol. 48. – № 6. – P. 633-636. doi: 10.3109/13880200903229098.
12. Voparai J.K., Sharma P.K. Mini Review on Antimicrobial Peptides, Sources, Mechanism and Recent Applications // *Protein Pept Lett*. – 2020. – Vol. 27. – № 1. – P. 4-16. doi: 10.2174/0929866526666190822165812.
13. Hart E.M, Bernhardt T.G. The mycomembrane // *Curr Biol*. – 2025. – Vol. 35. – № 3. – P. 85-86. doi: 0.1016/j.cub.2024.11.002.
14. Tang Z, Tan Y, Chen H, Wan Y. Benzoxazine: A Privileged Scaffold in Medicinal Chemistry // *Curr Med Chem*. – 2023. – Vol. 30. – № 4. – P. 372-389. doi: 10.2174/0929867329666220705140846.
15. Ndjoubi K.O., Sharma R., Hussein A.A. The Potential of Natural Diterpenes Against Tuberculosis // An Updated Review. *Curr Pharm Des*. – 2020. – Vol. 26. – № 24. – P. 2909-2932. doi: 10.2174/1381612826666200612163326.
16. Ковалевская В.С., Молодкина Н.Р., Тимофеев Т.И. Антагонистические свойства пробиотических штаммов молочнокислых бактерий // *Электронный сетевой политематический журнал «Научные труды КубГТУ»* – 2016. – № 14. – С. 785-791.
17. Коробов В.П., Лемкина Л.М., Полюдова Т.В. Механизм антибактериального действия лантибиотика варнерина // *Микробиология* – 2022. – Т. 91. № 2. – С. 217-225. – doi: 10.31857/S0026365622020070.
18. Clinical and laboratory standards institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement. M100-S17. Wayne, PA, 2007.
19. Штильман М.И., Подкорытова А.В., Немцев С.В. [и др.]. Технология полимеров медико-биологического назначения. Полимеры природного происхождения. – Москва: ООО «Издательство «БИНОМ. Лаборатория знаний», 2015. – 328 с. – (Учебник для высшей школы). – ISBN 978-5-9963-1564-2.
20. Смирнова Т.Г., Ларионова Е.Е., Андреевская С.Н., Севастьянова Э.В., Черноусова Л.Н. Тесты лекарственной чувствительности микобактерий. Часть 2. Метод пропорций на плотных питательных средах // *Вестник Центрального научно-исследовательского института туберкулеза*. – 2021. – № 3. – С. 79-90. doi: 10.7868/S2587667821030092.
21. Калинина А.А., Македошин А.С., Гурский Н.В., Соколова Т.Н., Смирнов В.Ф. Кинетическое исследование восстановления иоднитротетразолия хлорида суспензией в физиологическом растворе грамотрицательных бактерий *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli*. // *Теоретическая и прикладная экология* – 2018. №1. С. 25-32.
22. Скала Л.З., Сидоренко С.В., Нехорошева А.Г. [и др.]. Практические аспекты современной клинической микробиологии. - Москва, 2004. – 310 с.
23. Полюдова Т.В., Лемкина Л.М., Лихацкая Г.Н., Коробов В.П. Оптимизация условий получения и моделирование 3D-структуры нового антибактериального пептида семейства лантибиотиков // *Прикладная биохимия и микробиология* – 2017. – Т. 53. – № 1. – С. 47-54. – DOI 10.7868/S0555109917010147.
24. Hernandez C., Coppede J.S., Bertoni B.W., França S.C., Pereira A.M.S. Flash microbiocide: a rapid and economic method for determination of MBC and MFC // *Am J Plant Sci* – 2013. – № 4. – P. 850–852. doi: 10.4236/ajps.2013.44104.

25. Menon T., Umamaheswari K., Kumarasamy N., Solomon S., Thyagarajan S.P. Efficacy of fluconazole and itraconazole in the treatment of oral candidiasis in HIV patients // *Acta Tropica*. – 2001. – Vol. 80. – № 2. – P. 151-154. doi: 10.1016/S0001-706X(01)00170-X. ISSN 0001-706X
26. Andryukov B.G., Somova L.M., Timchenko N.F., Vynina M.P., Lyapun I.N. Toxin-antitoxin systems and their role in maintaining the pathogenic potential of causative agents of sapronoses // *Infect Disord Drug Targets*. – 2020. – Vol. 20. – № 5. – P. 570-584. doi: 10.2174/1871526519666190715150444.
27. Eroshenko D.V., Polyudova T.V., Pyankova A.A. VapBC and MazEF toxin/antitoxin systems in the regulation of biofilm formation and antibiotic tolerance in nontuberculous mycobacteria // *Int J Mycobacteriol*. – 2020. – Vol. 9. – № 2. – P. 156-166. doi: 10.4103/ijmy.ijmy_61_20.
28. Rather M.A., Gupta K., Mandal M. Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies // *Braz J Microbiol*. – 2021. – Vol. 52. – №4. – P. 1701-1718. doi: 10.1007/s42770-021-00624-x.
29. Balouiri M., Sadiki M., Ibsouda S.K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity // A review. *J Pharm Anal*. – 2016. – Vol. 6. – № 2. – P.71-79. doi: 10.1016/j.jpha.2015.11.005.
30. Полюдова Т.В., Полушкина А.В., Ерошенко Д.В., Коробов В.П. Антибактериальные эффекты стафилококцинов на биопленки *Mycobacterium smegmatis* mc2 155 // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. – 2018. – № 3. – С. 6.
31. Bugg T.D.H., Kerr R.V. Mechanism of action of nucleoside antibacterial natural product antibiotics // *J Antibiot (Tokyo)* – 2019. – Vol. 72. – №12. – P. 865-876. doi: 10.1038/s41429-019-0227-3.
32. Alexander J.L., Thompson Z., Cowan J.A. Antimicrobial metallopeptides // *ACS Chem Biol*. – 2018. – Vol. 13. – №4. – P. 844-853. doi: 10.1021/acscchembio.7b00989.
33. Finger S., Wiegand C., Buschmann H.J. Antibacterial properties of cyclodextrin–antiseptics–complexes determined by microplate laser nephelometry and ATP bioluminescence assay // *Int. J. Pharm.* – 2013. – Vol. 452. – № 1-2. – P. 188-193. doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.04.080.
34. Коробов В.П., Полюдова Т.В., Филатова Л.Б. и др. Активация аутолитической активности бактерий *Staphylococcus epidermidis* 33 низкомолекулярным катионным пептидом варнерином // *Микробиология*. – 2010. – Т. 79. – № 1. – С. 133-135.
35. Techaoei S. Time-kill kinetics and antimicrobial activities of Thai medical plant extracts against fish pathogenic bacteria // *J Adv Pharm Technol Res*. – 2022. – Vol.13. – № 1. –P. 25-29. doi: 10.4103/japtr.japtr_241_21.
36. Paparella A., Taccogna L., Aguzzi I. Flow cytometric assessment of the antimicrobial activity of essential oils against *Listeria monocytogenes*. // *Food Control*. – 2008. – № 19. – P. 1174-1182.
37. Polyudova T., Lemkina L., Eroshenko D., Esaev A. Suppression of planktonic and biofilm of *Escherichia coli* by the synergistic lantibiotics–polymyxins combinations // *Archives of Microbiology*. – 2024. – Vol. 206, No. 4. – P. 191. doi: 10.1007/s00203-024-03922-8.
38. Polyudova T.V., Eroshenko D.V., Korobov V.P. The effect of sucrose-induced osmotic stress on the sensitivity of *Escherichia coli* to bacteriocins // *Canadian Journal of Microbiology*. – 2019. – Vol. 65. – № 12. – P. 895-903. doi: 10.1139/cjm-2019-0292.
39. van Vuuren S, Viljoen A. Plant-based antimicrobial studies-methods and approaches to study the interaction between natural products // *Planta Med*. – 2011. – Vol. 77. – № 11. – P. 1168-82. doi: 10.1055/s-0030-1250736.
40. Кононова Л.И., Пьянков И.А., Смоляк А.А. и др. Синергидное действие катионного пептида хоминина и нового дезинфектанта на основе изохинолина на образование биоплёнок полирезистентных стафилококков // *Антибиотики и химиотерапия*. – 2020. – Т. 65. – № 5-6. – С. 11-18. – DOI 10.37489/0235-2990-2020-65-5-6-11-18.
41. Ianevski A., Giri A.K., Aittokallio T. SynergyFinder 2.0: visual analytics of multi-drug combination synergies // *Nucleic acids research* – 2020. – Vol. 48. – № 1. – P. 488-493. doi: 10.1093/nar/gkaa216.
42. Zhang M., Song Y., Wang J., Shi X., Chen Q., Ding R., Mou J., Fang H., Zhou Y., Chen R. Enhancement effect of static magnetic field on bactericidal activity // *Small*. – 2025. – Vol. 21. – № 18. doi: 10.1002/smll.202412334.
43. Yang X., Rai R., Huu C.N., Nitin N. Synergistic antimicrobial activity by light or thermal treatment and lauric arginate: membrane damage and oxidative stress // *Appl Environ Microbiol*. – 2019. – Vol. 85. – № 17. doi: 10.1128/AEM.01033-19.

REVIEW OF APPROACHES TO DETERMINING THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY
OF NEW NATURAL AND SYNTHETIC COMPOUNDS

Polyudova T.V.¹, Antipyeva M.V.¹, Lobanov A.N.¹, Eroshenko D.V.^{1,2}

¹*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS*

²*Institute of Technical Chemistry UB RAS*

For citation:

Polyudova T.V., Antipyeva M.V., Lobanov A.N., Eroshenko D.V. Review of approaches to determining the antibacterial activity of new natural and synthetic compounds // Perm Federal Research Center Journal. – 2025. – № 4. – P. 36–48. <https://doi.org/10.7242/2658-705X/2025.4.3>

The rapidly growing threat of microbial resistance has driven increased interest in the research and development of new antimicrobial agents from various sources. Consequently, increasing attention is being paid to methods for screening and assessing antimicrobial activity. Some testing methods, such as disk diffusion, agar well diffusion, and broth dilution, are well-known and widely used. However, methods for assessing antibiofilm activity and identifying and inhibiting dormant forms have not been widely adopted. Methods such as flow cytometry, fluorescence, and bioluminescence provide rapid results for assessing the activity of antimicrobial compounds and understanding their impact on cell viability and damage, but require specialized equipment and subsequent assessment of the reproducibility and standardization. This article provides an overview of bacterial susceptibility testing methods used to analyze new compounds with antibacterial potential. It presents widely known and laboratory-developed methods for detecting antibacterial activity. These include methods for identifying antagonist strains that produce antimicrobial compounds, quantitative assessment of antibacterial activity, identification of dormant forms of bacteria, inhibition of bacterial adhesion on a solid surface, the effect of antibacterial compounds on the biofilm formation and the destruction of mature biofilms, and studying the mechanism of action, as well as enhancing antimicrobial properties.

Keywords: antibacterial activity, antibacterial compounds, minimum inhibitory concentration, biofilm, dormant form.

Сведения об авторах

Полюдова Татьяна Вячеславовна, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией биохимии развития микроорганизмов, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН («ИЭГМ УрО РАН»), 614081, г. Пермь, ул. Голева, д. 13; e-mail: polyudova@iegm.ru

Антипьева Марина Владимировна, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник, «ИЭГМ УрО РАН»; e-mail: girmar@mail.ru

Лобанов Александр Николаевич, инженер, аспирант, «ИЭГМ УрО РАН»; e-mail: lobanov.aleksandr.n@gmail.com

Ерошенко Дарья Владимировна, кандидат биологических наук, инженер «ИЭГМ УрО РАН», научный сотрудник, Институт технической химии УрО РАН – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН («ИТХ УрО РАН»), 614013, г. Пермь, ул. Академика Королева, д. 3; e-mail: dasha.eroshenko@gmail.com

Материал поступил в редакцию 14.10.2025