

УДК 543.421/.424:579.22:577.11

ОСОБЕННОСТИ МЕТОДОЛОГИИ ИНФРАКРАСНОЙ ФУРЬЕ-СПЕКТРОСКОПИИ И ИНТЕРПРЕТАЦИИ СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИХ ДАННЫХ ПРИ АНАЛИЗЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

© 2023 г. А. А. Камнев^а *, А. В. Тугарова^а

^аИнститут биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра “Саратовский научный центр Российской академии наук”

просп. Энтузиастов, 13, Саратов, 410049 Россия

*e-mail: a.a.kamnev@mail.ru, aakamnev@ibprrm.ru

Поступила в редакцию 08.04.2023 г.

После доработки 27.04.2023 г.

Принята к публикации 03.05.2023 г.

В данном мини-обзоре рассмотрены некоторые из наиболее значимых с точки зрения авторов особенностей методологии инфракрасной фурье-спектроскопии и интерпретации экспериментально получаемых спектроскопических данных в применении к молекулярно-спектроскопическому анализу микробиологических объектов на примерах, опубликованных в специальной научной литературе в основном в последние годы. Приведены и кратко обсуждены также примеры характерных неточностей и ошибок как методологического характера, так и возникающих при интерпретации спектроскопических данных.

Ключевые слова: биологические и медицинские объекты, инфракрасная спектроскопия, молекулярная микробиология, клеточная биомасса, биопленки, биомакромолекулярный состав.

DOI: 10.31857/S0044450223100109, **EDN:** Z1HVZI

Инфракрасные (ИК) спектры различных типов микроорганизмов (бактерий, дрожжей, грибов, микроводорослей (algae), вирусов) начали изучать еще в середине XX в. При этом в обзоре на данную тему Норрис (1959) [1] отмечал основные трудности, заключающиеся, помимо высокой стоимости аппаратуры и сильного поглощения содержащихся в микробиологических образцах следов воды, в целом в непрактичности и трудоемкости методологии, в особенности для целей идентификации микроорганизмов. Отмечалось также, что при ИК-спектроскопическом исследовании вирусов основной сложностью является их отделение от сопутствующего биологического материала [1]. Следует отметить, что ИК-спектроскопическое оборудование того периода не отличалось высокой чувствительностью и разрешающей способностью. Впоследствии, начиная с 80-х годов XX в., положение улучшилось с появлением ИК-фурье-спектрометров, в значительной степени способствовавших развитию данной области исследований [2, 3], которое продолжается до сих пор.

Одним из наиболее ценных, профессиональных и высокоинформативных руководств как для специалистов, так и для начинающих применять

метод ИК-фурье-спектроскопии (ИКФС) в микробиологии, на наш взгляд, до сих пор остается ставшая классической энциклопедическая обзорная глава Науманна в книге [3], впервые опубликованная в 2000 г., содержащая большое число примеров, экспериментальных данных, а также информативное обсуждение сути метода ИК-спектроскопии, его возможностей и основных наблюдаемых с его помощью характеристик. Среди огромного и ежегодно увеличивающегося числа микробиологических исследований с использованием ИКФС последних лет можно выделить ряд обзорных работ. В некоторые из них наряду с прочими инструментальными методами изучения микробиологических объектов включена достаточно общая информация о методе ИК-спектроскопии (в разных вариантах измерений), обычно ограниченная по объему [4–11]. Информация иного рода, чаще всего более детальная, содержится как в обзорах по различным аспектам применения ИКФС в микробиологии [12–17], так и в общих обзорах по разным аспектам применения метода к биологическим объектам (см., например, [18, 19]). Особый интерес представляют обзоры данных по ИК-спектроскопическому изучению отдельных типов био(макро)молекул, составляющих значительную

Таблица 1. Общий биомакромолекулярный состав (% от сухой биомассы) клеток микроорганизмов – прокариотов (бактерии) и эукариотов (дрожжи) (по данным [3])

Тип биомакромолекул	Бактерии	Дрожжи
Белки	40–60	40–50
Углеводы	10–20	10–25
Жиры	10–15	5–20
РНК	5–15	3–10
ДНК	2–4	1–3

часть любых микробиологических систем, в первую очередь белков [20–24], сахаров, олиго- и полисахаридов [25], липидов [24, 26]. Эти обзорные статьи наряду с отдельными профессионально выполненными экспериментальными работами в совокупности представляют собой ценную “базу данных” для исследователей, интерпретирующих ИК-спектры собственных микробиологических образцов.

С точки зрения методологии ИКФС в некоторой степени близкими к тематике настоящей статьи можно рассматривать публикации обзорного типа с описанием специализированных протоколов измерений для биологических систем (см., например, [27–31], а также главы 9, 11, 15, 16 в монографии [32]). Отметим, что, хотя некоторые из указанных протоколов включают ИК-спектроскопический анализ биологических тканей [29, 31], некоторые существенные методологические детали биоспектроскопического анализа являются во многом общими, особенно для таких сложных супрамолекулярных объектов, как микробные клетки и биопленки. Сам факт регулярного появления целого ряда таких руководств свидетельствует о сложности и неоднозначности методологических приемов ИКФС при работе с подобными биологическими образцами и об актуальности данной тематики.

В настоящей работе нами не ставилась задача рассмотреть основные опубликованные даже за последние годы работы по применению ИКФС в микробиологических исследованиях – их число слишком велико, причем уровень представленных материалов как в методологическом отношении, так и в отношении интерпретации спектроскопических данных сильно различается. Вместо этого обсуждены некоторые наиболее значимые, с точки зрения авторов, особенности методологии ИКФС и интерпретации экспериментально получаемых спектроскопических данных в применении к анализу микробиологических объектов на характерных примерах из результатов, опубликованных в специальной научной литературе, включая собственные работы авторов. Рассмотрены также некоторые типичные неточности и ошибки, встречающиеся даже в статьях, публикуемых достаточно высокорейтинговыми специализированными

международными журналами. Приведенные сведения дополняют имеющиеся в литературе обзорные работы, обсуждавшиеся выше, и будут полезны исследователям, использующим метод ИКФС для микробиологических анализов.

ОСОБЕННОСТИ МЕТОДОЛОГИИ ИК-ФУРЬЕ-СПЕКТРОСКОПИИ ПРИ АНАЛИЗЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

Одним из основных факторов, которые могут затруднять изучение относительного содержания и структуры биомакромолекул в клетках микроорганизмов (общий состав которых приведен в табл. 1) методом ИКФС, является обычное для нативных биологических материалов значительное содержание воды в образцах, молекулы которой сильно поглощают в соответствующих областях ИК-спектра [33, 34]. В частности, наиболее существенной является заметно уширенная¹ достаточно интенсивная полоса поглощения в области деформационных (ножничных) колебаний $\delta(\text{H}-\text{O}-\text{H})$ около 1640 см^{-1} , перекрывающаяся с областью колебаний амид-I пептидных связей белков с различными типами вторичной структуры (полосы в области $\sim 1620-1690 \text{ см}^{-1}$) [20, 35, 36]. Исключение вклада воды в этом случае представляет собой известную проблему и требует применения специальных приемов, строгой стандартизации параметров образцов и режимов измерений [35–40]. В случае микробиологических образцов это не всегда легко достижимо, в том числе при применении специального оборудования и методологии, например микрогидродинамической системы и ИК-фурье-микроспектроскопии с использованием синхротронного излучения [41]. В случае применения ИК-спектроскопической методологии нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО; attenuated total reflectance, ATR) [35–37, 40] при исследовании водных суспензий бактериальной биомассы или биопленок (как и в случае исследования, к примеру, водных растворов белков) используют вычитание вклада воды, полученного контрольным измерением ИК-спектра водного слоя. При этом точность измерений может снижаться из-за значительно более высокой интенсивности поглощения воды по сравнению с интенсивностью полос самого биоматериала [35].

Другим подходом к снижению вклада содержащейся в образце воды является высушивание биомассы отделенных от культуральной среды клеток (или биопленок) [30, 42–45]. В основе применимо-

¹ Для колебательных полос воды (в том числе в виде примесей) в конденсированной фазе в ИК-спектрах характерно заметное уширение, связанное с наличием достаточно прочных водородных связей, образуемых молекулами H_2O , энергия которых, влияющая на частоту всех колебаний $\text{H}-\text{O}-\text{H}$, различна в зависимости от локального молекулярного окружения молекул воды [33, 34].

сти этого способа, как показали многочисленные исследования, лежит то, что нативная структура и функциональная активность биомакромолекул и надмолекулярных структур при этом в определенных условиях могут существенно не изменяться; при этом клетки микроорганизмов обратимо переходят в физиологически неактивную (дормантную) форму [46–49]. Как известно, высушенные препараты микроорганизмов (в том числе путем лиофилизации) могут достаточно длительно храниться, и клетки в них остаются живыми, что широко используется в различных областях биотехнологии [50–52]. Следует, однако, отметить, что при высушивании некоторых микроорганизмов возможно протекание окислительно-восстановительных процессов, в том числе разрушительных – в особенности при хранении сухих препаратов [53]. При этом метод ИКФС (наряду с другими инструментальными неразрушающими методами) может быть весьма информативен для сравнительного анализа общего макромолекулярного состава сухих клеток и последствий указанных процессов [45, 47, 54–56].

Высушенные образцы микробной биомассы могут быть исследованы методом ИКФС как в режиме НПВО, так и в режимах пропускания или диффузного отражения (ДО) [3, 30, 42–45, 54, 56]. Методология ИКФС-ДО, хотя и требует специальной приставки к прибору, позволяет использовать сухую биомассу практически без дополнительной пробоподготовки и в малом количестве (в том числе без использования галогенидной матрицы (KBr) для запрессовывания образцов). При этом сравнительный анализ интенсивности и положения полос (в целом совпадающих с полосами поглощения ввиду того, что ИК-излучение, диффузно отраженное от поверхности порошкообразного или шероховатого материала и “собираемое” специальным вогнутым зеркалом, содержит информацию о его поглощении в поверхностном слое) дает во многом ту же структурную и количественную информацию, что и традиционный режим поглощения [2, 43, 54, 57].

Экспериментально показано [30, 50], что для исследования сухих микробных биомасс методом ИКФС лиофилизация необязательна. Для проведения достаточно информативного анализа вполне приемлемо высушивание биомассы, отмытой от компонентов культуральной среды, на воздухе (при комнатной температуре, в том числе для ускорения процесса – в эксикаторе с водопоглощающим агентом, либо в сушильной камере при небольшом нагревании, которое не должно превышать $\sim 45\text{--}50^\circ\text{C}$, чтобы исключить процессы термической денатурации клеточных белков) [3, 27, 30, 42–48, 54, 57, 58]. Отметим, что стадия отмывания биомассы клеток или био пленки от компонентов, входящих в состав питательной среды (в большинстве случаев это источники углерода –

соли карбоновых кислот или дрожжевой экстракт, а также неорганические соли (включая фосфаты) калия, натрия, аммония и небольшого количества микроэлементов – железа, кальция, магния, молибдена и др.), является существенной: как показано в работе [59], для исключения вклада полос указанных компонентов в ИК-спектр сухой биомассы необходимо использовать более одной стадии ее отмывания физиологическим раствором (его лучше применять вместо воды для исключения осмотического стресса для клеток). Помимо этого, длительность высушивания (в зависимости от его условий) должна быть достаточной (для не слишком малых количеств биомассы обычно используется высушивание “до постоянной массы”).

Рис. 1 иллюстрирует воспроизводимость ИК-спектров биомассы (использованы несколько миллиграммов) бактерий при высушивании на воздухе при 45°C в течение 1.5 ч (что приводит к получению визуально практически сухого образца) и в течение 23 ч (по данным [60]; все параллельно измеренные спектры для сравнения интенсивностей пиков были нормированы по интенсивности полосы амид-I клеточных белков с максимумом $\sim 1650\text{ см}^{-1}$). Результаты показывают, что варианты образцов, высушенных в течение 1.5 ч (рис. 1а), заметно различаются (максимальные различия интенсивностей полос достигают 20–39% в разных областях спектра), что указывает на наличие различных количеств остаточных следов воды в данных образцах и ее неодинаковое влияние на полосы поглощения разных функциональных групп, в том числе в области их перекрывания. Как известно [33, 34, 37–40, 30, 58], вода в конденсированной фазе обладает сильным поглощением в области валентных колебаний водородосвязанных групп О–Н (широкая асимметричная область поглощения при $\sim 3500\text{--}2500\text{ см}^{-1}$; в этой же области поглощают все ОН-группы биомакромолекул, в первую очередь полисахаридов) и ниже 1000 см^{-1} (широкая интенсивная полоса с максимумом в области $600\text{--}800\text{ см}^{-1}$; либрационные колебания H_2O). Выше отмечена также роль умеренно интенсивной полосы поглощения в области деформационных (ножничных) колебаний $\delta(\text{H-O-H})$ около 1640 см^{-1} , перекрывающейся с областью колебаний амид-I пептидных связей белков, что в данном случае вносит дополнительные различия в ИК-спектры при изучении недостаточно высушенного образца. (Заметим, однако, что при значительно более тонком слое образцов биомассы полное высушивание, достаточное для получения качественного ИК-спектра, разумеется, может быть достигнуто быстрее, за время порядка 1–2 ч [27, 58], даже при комнатной температуре [45].)

Высушивание в течение 23 ч (рис. 1б) привело к удовлетворительному совпадению спектров при параллельных измерениях. Таким обра-

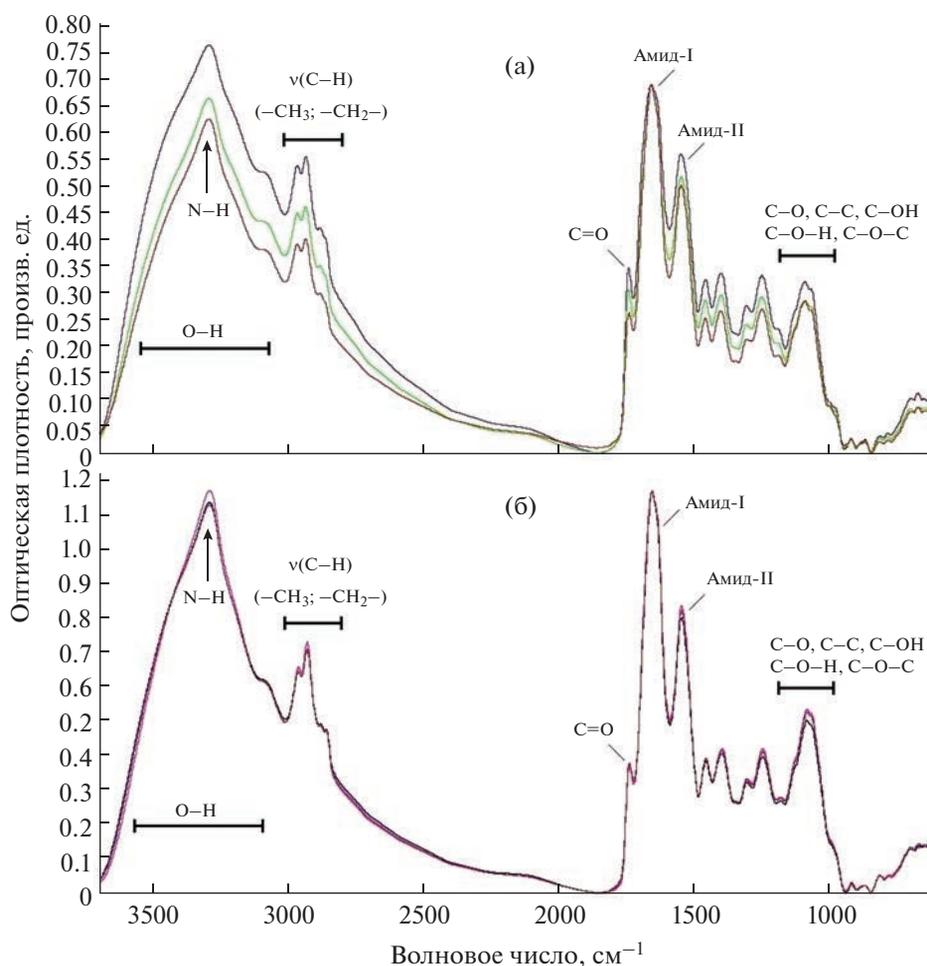


Рис. 1. ИК-спектры образцов биомассы бактерии *Azospirillum brasilense* Sp7, высушенных при 45°C в течение (а) 1.5 ч и (б) 23 ч (по три параллельных измерения с наложением спектров, нормированных по интенсивности полосы амид-I клеточных белков). Спектры измерены в режиме пропускания в виде тонких пленок на дисках из ZnSe (рисунок подготовлен авторами с использованием данных, представленных в работе [60]).

зом, указанный режим высушивания вполне подходит для подготовки не слишком малых количеств клеточной биомассы или биопленок для сравнительных ИК-спектроскопических анализов, особенно при необходимости проведения дополнительных химических анализов их состава [59, 60].

Отметим также, что рис. 1б представляет собой типичный пример спектра образцов сухой клеточной биомассы бактерий, в котором на фоне широкой области валентных колебаний ОН-групп $\nu(\text{O-H})$ полисахаридов выделяются полосы валентных колебаний амидов $\nu(\text{N-H})$ и характерная область различных валентных колебаний $\nu(\text{C-H})$ алифатических групп (в первую очередь симметричные (ν_s) и антисимметричные (ν_{as}) колебания групп $-\text{CH}_3$ и $-\text{CH}_2-$, представляющие серию менее интенсивных полос в области ~ 3000 – 2800 см^{-1}) [59, 60]. Наиболее информативны типичные для всех белков полосы амид-I и амид-II [3, 20, 23, 35, 36, 43, 61–63]; очень характерная по-

лоса валентных колебаний карбонильной группы $\nu(\text{C=O})$, в данном случае (около 1740 см^{-1}) небольшой интенсивности, отвечающая в основном сложноэфирной группе (клеточные липиды, а также синтезируемые и накапливающиеся в определенных условиях резервные вещества класса сложных полиэфиров – полигидроксиалканоатов, ПГА) [3, 30, 42–44, 54, 57–60, 64–69]; область различных колебаний полисахаридов и полисахаридсодержащих биомакромолекулярных комплексов (~ 1200 – 950 см^{-1}) [3, 25, 30, 59, 60].

Использование тонкой пленки биомассы бактерий при измерениях ИК-фурье-спектров в режиме НПВО в процессе спонтанного высушивания позволяет проследить не только за изменением в спектрах в процессе удаления воды (рис. 2а), но и выявить различия в поведении внутриклеточного резервного биополимера – поли-3-гидроксIBUTИРАТА (ПГБ) (рис. 2б, 2в). На рис. 2 приведены ИК-спектры НПВО для бактерии *Cupria-*

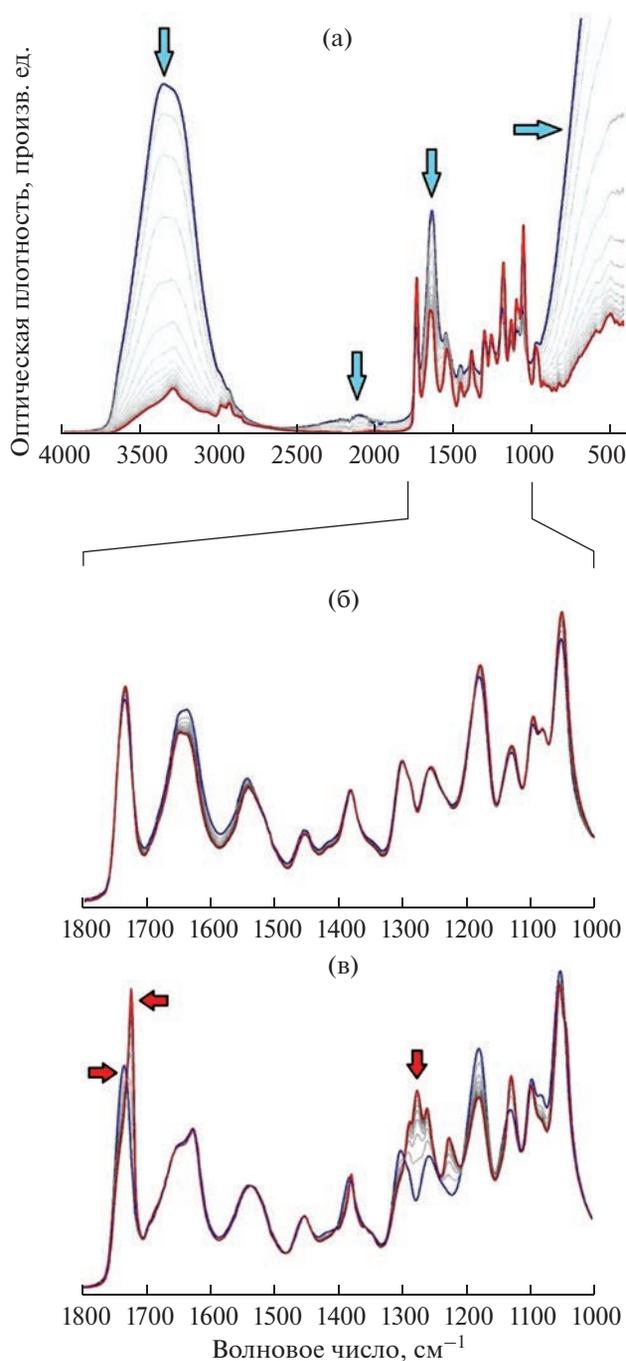


Рис. 2. ИК-спектры в режиме нарушенного полного внутреннего отражения (алмазная приставка с однократным отражением) тонкой пленки биомассы бактерии *Cupriavidus necator* H16. (а) Измерения в процессе высыхания в течение времени от 0 (спектр с наибольшими интенсивностями полос, отмеченных стрелочками) с интервалами 10 мин (промежуточные спектры) до 160 мин (спектр с наименьшими интенсивностями полос, отмеченных стрелочками); стрелочками отмечены характерные полосы колебаний воды. (б) Измерения в области $1800\text{--}1000\text{ см}^{-1}$ в процессе высыхания от 60 до 150 мин (с промежуточными спектрами с интервалом 10 мин) той же биомассы (контроль). (в) Измерения в области $1800\text{--}1000\text{ см}^{-1}$ в процессе высыхания от 60 до 150 мин (с промежуточными спектрами с интервалом 10 мин) биомассы, предварительно подвергнутой термическому стрессу (80°C в течение 90 мин в фосфатном буферном растворе с рН 7.4); основные изменения в спектрах, связанные с кристаллизацией резервного вещества (поли-3-гидроксibuтирата), указаны стрелочками. (Рисунок подготовлен авторами с использованием данных, представленных в работе [58]).

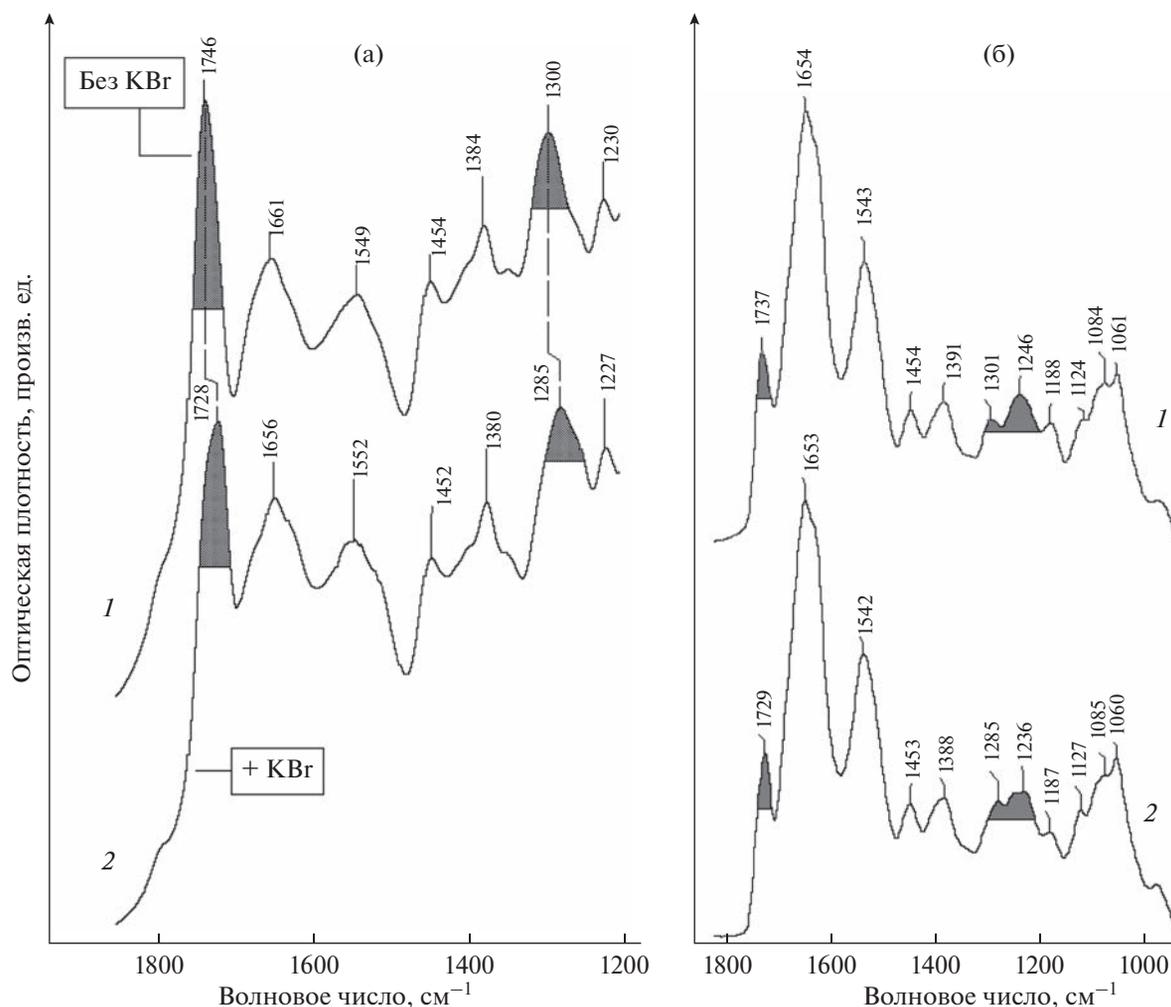


Рис. 3. ИК-спектры образцов высушенной биомассы бактерии *Azospirillum baldaniorum* Sp245. Измерения проведены (а) в режиме диффузного отражения (1) в виде порошка без применения KBr и (2) после измельчения с KBr [66]; (б) в режиме пропускания в виде пленки на поверхности диска из ZnSe (1) без измельчения сухой биомассы и (2) после ее измельчения [60]. Полосы, для которых наблюдаются наибольшие сдвиги частот максимумов, выделены штриховкой (рисунок подготовлен авторами с использованием данных, представленных в работах [60, 66]).

vidus necator, являющейся важным продуцентом ПГБ, накапливающим его до 90% от сухой биомассы [69], в процессе спонтанного удаления воды (по данным [58]). Из данных рис. 2б (увеличенная по масштабу часть рис. 2а со спектрами, измеренными в интервале от 60 до 150 мин) видно, что после 60 мин спонтанного высушивания вплоть до 2.5 ч изменения, наблюдаемые в наиболее информативной части спектра (1800–1000 см⁻¹), незначительны; в частности, полосы поглощения практически не меняют своего положения. Тем не менее аналогичный спектр для той же биомассы, предварительно подвергнутой термическому стрессу (80°C в течение 90 мин в фосфатном буферном растворе с pH 7.4), показал, что в процессе удаления воды полосы ПГБ претерпели изменения (рис. 2в). Указанный сдвиг полосы $\nu(\text{C}=\text{O})$ (от 1734 до 1719 см⁻¹) и соответствующие измене-

ния в области колебаний C–C–O сложноэфирной группы ПГБ (1300–1200 см⁻¹) свидетельствуют о протекании спонтанной кристаллизации биополимера [58]. Авторы работы [58] на основании наблюдения за морфологическими изменениями клеток *C. necator* при указанной гидротермической обработке с последующим высушиванием связывали эти изменения степени кристалличности с коагулирующей гранул биополимера и удалением из них следов воды, играющей роль “пластификатора”. (Отметим также, что сравнение рис. 2б и 2в показывает отчетливое изменение формы полос клеточных белков, в особенности полосы амид-I около 1650 см⁻¹, очевидно, связанное с денатурацией белков при термической обработке (см. рис. 2в)).

В ряде случаев при ИК-спектроскопических исследованиях небольших количеств биомассы

Таблица 2. Химический состав (содержание компонентов, мас. %) липополисахарида (ЛПС), выделенного из клеток, матрикса биопленки (МБ) и его фракций (МБ1 и МБ2), полученных хроматографическим разделением матрикса, а также полисахаридной фракции матрикса биопленки (МБ3), полученной его мягким кислотным гидролизом, бактерии *Azospirillum baldaniorum* Sp245 (по данным [59])

Компонент	ЛПС	МБ	МБ1	МБ2	МБ3
Общие сахара	55.4 ± 4.5	9.1 ± 1.0	42.1 ± 3.4	10.4 ± 1.8	62.3 ± 4.8
Белки	—	67.4 ± 0.4	18.7 ± 1.5	53.2 ± 3.7	—

до сих пор используется прессование перетертых и смешанных с порошком КВг сухих образцов в специальные таблетки при измерениях в режиме пропускания [30, 39, 45], а также без прессования – для использования метода ИКФС-ДО (см. работу [66] и цитируемые в ней публикации). Однако специальное исследование на примерах различных биологических образцов, включая высушенную микробную биомассу, показало [66], что растирание биомассы с КВг (даже без прессования) приводит к сдвигам максимумов основных полос ряда полярных функциональных групп.

На рис. 3а представлены ИК-фурье-спектры, полученные в режиме ДО, для порошка сухой биомассы бактерии *Azospirillum baldaniorum* Sp245 (выращенной в условиях, соответствующих накоплению в клетках резервного материала – ПГБ [66], гомополимера, характерного для азоспирилл [42, 43, 54, 57]), в том числе после измельчения с КВг. Как видно из спектроскопических данных, основные полосы ПГБ – $\nu(\text{C}=\text{O})$ (около 1740 см^{-1}) и колебания $\text{C}-\text{C}-\text{O}$ (около 1300 см^{-1}) сложноэфирного фрагмента – после измельчения в присутствии КВг сдвигались соответственно с 1746 до 1728 см^{-1} и с 1300 до 1285 см^{-1} , т.е. на 18 и 15 см^{-1} . Такое значительное смещение максимумов полос, которые, как известно, чувствительны к степени кристалличности ПГБ [43, 58, 60, 67], свидетельствует об индуцируемом данным механическим воздействием (в присутствии полярной матрицы КВг) процессе кристаллизации клеточного ПГБ, изначально присутствующего в клетках в виде аморфных гранул [66, 68].

Важно отметить, что для сухой биомассы *A. baldaniorum* Sp245, выращенной в отличающихся условиях (с меньшим накоплением ПГБ), процесс измельчения в отсутствие КВг приводил к аналогичному по направлению, хотя и меньшему по величине сдвигу указанных полос (8 см^{-1} для полосы $\nu(\text{C}=\text{O})$ около 1740 см^{-1} [60]) (рис. 3б). Для остальных полос в спектрах на рис. 3 положение максимумов практически не изменялось в пределах инструментальной погрешности прибора ($\pm 2-4\text{ см}^{-1}$), хотя на рис. 3а (в случае более “жесткого” воздействия полярной матрицы КВг) можно также заметить некоторые изменения формы полос амид-I и амид-II.

Таким образом, для анализа *in situ* нативных внутриклеточных биополимеров (без их выделения) методом ИКФС следует учитывать возможное влияние подобных воздействий при пробоподготовке [60]. При этом в процессе кристаллизации ПГБ (и других ПГА) форма и ширина полосы $\nu(\text{C}=\text{O})$, которая наиболее удобна для количественного анализа *in situ* данного биополимера (и других полигидроксиалканоатов [3, 67]), могут в существенной степени меняться (см., например, рис. 2в). В этом случае, как показано в работе [68], более точное определение и сравнение содержания ПГБ в биомассе клеток следует проводить с учетом не интенсивности (высоты) пика $\nu(\text{C}=\text{O})$, а его площади.

ОСОБЕННОСТИ ИНТЕРПРЕТАЦИИ ИК-СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИХ ДАННЫХ ПРИ АНАЛИЗЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

Одной из важнейших характеристик метода ИКФС является его чувствительность не только к структуре и количественному содержанию определенных соединений (в биологических образцах это соответствует наличию определенных функциональных групп в биомакромолекулах и надмолекулярных биоорганических комплексах), но и к различным внутри- и межмолекулярным взаимодействиям [3, 19]. Последние, как известно, играют важнейшую роль в поддержании нативной структуры биомакромолекул и их функциональной активности. Эта чувствительность ИКФС, с одной стороны, может в значительной степени затруднять интерпретацию спектроскопических данных, поскольку под воздействием внутри- и межмолекулярных взаимодействий (в первую очередь, водородных связей) энергия молекулярных колебаний и, соответственно, частота полос определенных функциональных групп может меняться; могут также появляться дополнительные полосы в спектре. С другой стороны, в этом заключается существенное преимущество метода, позволяющее данные взаимодействия детектировать и исследовать в неразрушающем режиме *in situ* и *in vivo* [3, 19, 30]. Указанные физико-химические закономерности метода ИКФС, а также перекрывание диапазонов частот, характерных для различных функциональных групп, являются основной сложностью,

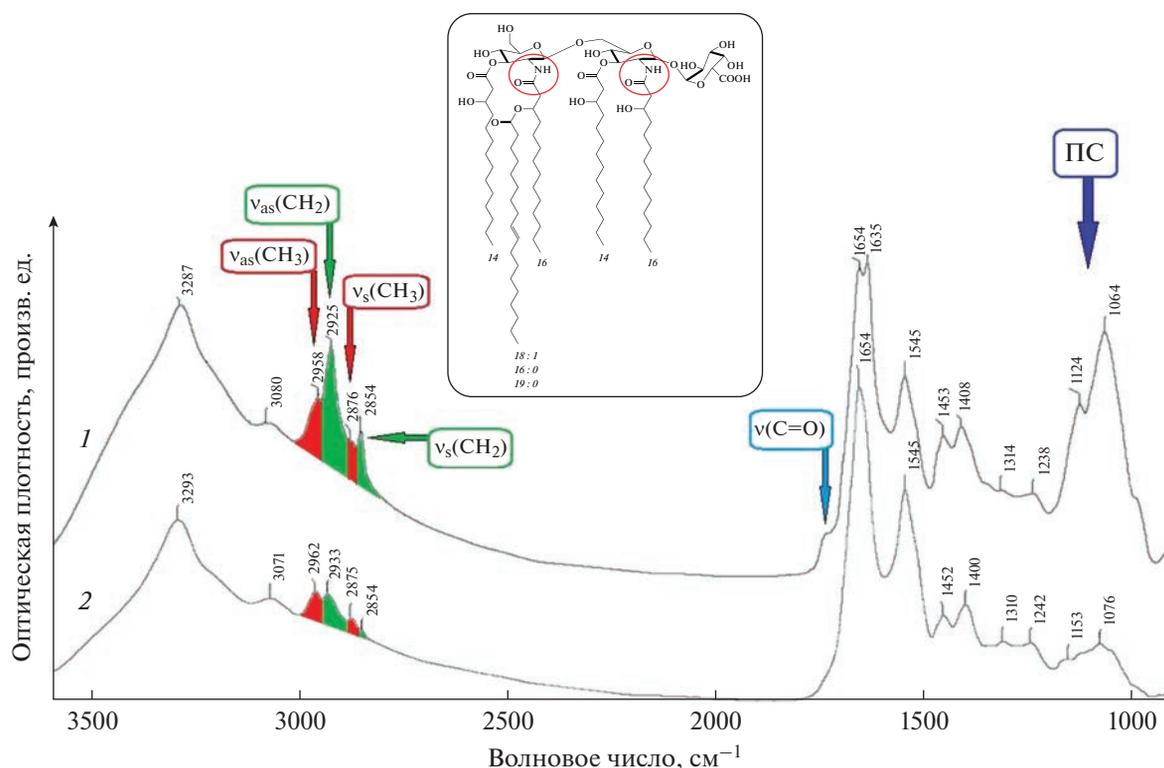


Рис. 4. ИК-спектры двух фракций матрикса биопленки бактерии *Azospirillum baldaniorum* Sp245, полученных его хроматографическим разделением: (1) МБ1 и (2) МБ2 (см. табл. 2; по данным [59]). Стрелочки отмечены характерные полосы симметричных (ν_s) и антисимметричных (ν_{as}) валентных колебаний групп $-\text{CH}_3$ и $-\text{CH}_2-$, $\nu(\text{C}=\text{O})$ сложноэфирного фрагмента, а также характерная область колебаний полисахаридов (ПС). Во вставке показана структурная формула липида А липополисахарида, типичного для азоспирилл [70] (с выделенными овалом областями амидных связей $(\text{C}=\text{O})-\text{NH}$). (Рисунок подготовлен авторами с использованием данных, представленных в работах [59, 70]).

требующей определенного опыта и квалификации исследователя. Этим объясняется тот факт, что метод ИКФС, давно использующийся в области материаловедения в качестве рутинного инструмента, в науках о жизни, включая микробиологию, до сих пор не стал рутинным, несмотря на постоянно растущее число работ с его применением.

Помимо анализа характерных интенсивных полос, в первую очередь тех, которые не перекрываются с другими полосами колебаний (таких как обсуждавшаяся выше полоса $\nu(\text{C}=\text{O})$ около 1740 см^{-1} , характерная для сложных полиэфигов класса ПГА [3, 43, 57–60, 66–68]), более слабые полосы в ИК-спектрах, например, в области различных колебаний $\nu(\text{C}-\text{H})$ алифатических групп ($\sim 3000\text{--}2800\text{ см}^{-1}$), также могут дать ценную информацию, особенно в совокупности с данными других методов или результатами химического анализа. В качестве примера рассмотрим ИК-фурье-спектры образцов двух фракций матрикса биопленки бактерии *Azospirillum baldaniorum* Sp245, полученных его хроматографическим разделением (рис. 4), характеризующихся различным распределением молекулярных масс макрокомпонентов (80–40 кДа для МБ1 и 35–20 кДа для МБ2; табл. 2) [59].

В первую очередь из спектров на рис. 4 следует, что поглощение в полисахаридной области колебаний ($\sim 1200\text{--}950\text{ см}^{-1}$) для фракции МБ1 значительно более интенсивно, чем для МБ2. Это хорошо соответствует данным химического анализа (см. табл. 2), показывающим, что общее содержание сахаров в МБ1 в четыре раза выше, чем в МБ2. Поскольку углеводная часть данных фракций представлена липополисахаридом [59, 70], этому вполне соответствует более заметное плечо на спектре фракции МБ1 в области колебаний $\nu(\text{C}=\text{O})$ около 1740 см^{-1} .

Следует специально отметить, что в сложных полиэфирах класса ПГА (и, в частности, ПГБ) каждая единица мономера содержит карбонильную группу, и при его накоплении в заметных количествах полоса $\nu(\text{C}=\text{O})$ в ИК-спектрах становится заметной даже в микробной биомассе [3, 57, 66–68]. В отличие от этого, в составе липида доля сложноэфирного фрагмента $[-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-]$ невелика (см., например, вставку на рис. 4); кроме того, содержание липидов в клетке бактерий обычно порядка 10% (см. табл. 1). В результате при отсутствии накопления ПГА в ИК-спектрах клеточной биомассы полоса $\nu(\text{C}=\text{O})$ около 1740 см^{-1}

липидных компонентов представлена в виде очень слабого (часто малозаметного) плеча у левого крыла полосы амид-I клеточных белков [3, 68].

Из рис. 4 также видно, что в целом область более слабых колебаний алифатических групп $\nu(\text{C-H})$ ($3000\text{--}2800\text{ см}^{-1}$) для фракции МБ1 также заметно интенсивнее (вклад в нее вносят алифатические группы не только липидов, но и боковых цепей аминокислотных остатков белков и других биомолекул). Более того, сравнение этой области для фракций МБ1 и МБ2 показывает, что для МБ1 относительная интенсивность обеих полос валентных колебаний метиленовых групп $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ и $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ по сравнению с соответствующими колебаниями концевых метильных групп $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$ и $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$ значительно выше, чем для МБ2. Это находится в полном соответствии с повышенным содержанием сахаров (представленных в составе липополисахарида, ЛПС) в МБ1 по сравнению с МБ2 (см. табл. 2), поскольку липидная часть ЛПС содержит длинные алифатические цепи жирнокислотных остатков (см. вставку на рис. 4).

Таким образом, тщательный анализ различных областей ИК-спектра даже для таких многокомпонентных и неоднородных по составу объектов, как микробные клетки, био пленки и их макросоставляющие, измерение которого значительно менее трудоемко, чем проведение химических анализов, может дать ценную информацию об относительном макромолекулярном составе образцов.

Что касается анализа состава матрикса био пленки, необходимо отметить еще один важный момент. Для полисахаридной фракции матрикса, полученной его мягким кислотным гидролизом [59], в ИК-спектре данной фракции (МБ3; см. также табл. 2) присутствуют характерные полосы в области амид-I и амид-II при 1638 и 1545 см^{-1} соответственно (рис. 5). При этом как по данным химического анализа (табл. 2), так и по результатам электрофореза в полиакриламидном геле (SDS-PAGE) в составе данной фракции белок отсутствует, а полисахарид представлен в составе ЛПС [59] (в левом крыле широкой полосы амид-I на рис. 5 выше 1700 см^{-1} можно заметить вклад колебаний $\nu(\text{C=O})$, соответствующих ЛПС, сложноэфирных фрагментов $[-(\text{C=O})-\text{O}-]$; см. вставку к рис. 4). В данном случае появление полос амид-I и амид-II в отсутствие белковых макрокомпонентов объясняется наличием амидных связей в липиде А в составе ЛПС (см. вставку к рис. 4; амидные связи $[-\text{NH}-(\text{C=O})-]$ выделены овалом). Этот факт необходимо учитывать при анализе спектроскопических данных сложных (микро)биологических образцов.

Отметим также, что полоса амид-I на рис. 5 имеет максимум при 1638 см^{-1} . Вероятно, с этим может быть связано расщепление полосы амид-I в спектре фракции МБ1 (см. рис. 4, спектр I), ко-

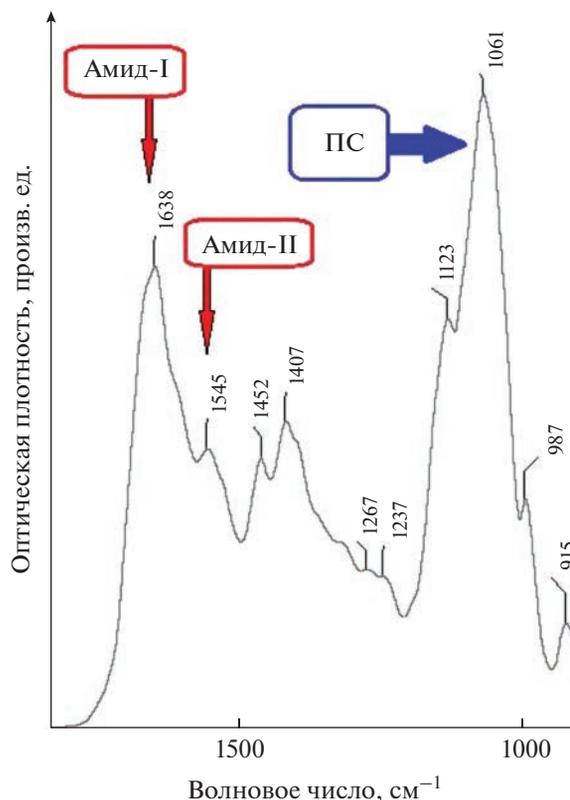


Рис. 5. ИК-спектр полисахаридной фракции матрикса био пленки бактерии *Azospirillum baldaniorum* Sp245, полученной его мягким кислотным гидролизом (МБ3; см. табл. 2; по данным [59]). Стрелочками отмечены полосы амид-I и амид-II, а также характерная область колебаний полисахаридов (ПС). (Рисунок подготовлен авторами с использованием данных, представленных в работе [59]).

торая, помимо белка (ему соответствует обычная полоса амид-I с максимумом при 1654 см^{-1} , характерным для α -спирали [3, 20, 23, 35, 36]), содержит также значительную долю ЛПС (см. табл. 2 по содержанию сахаров в составе ЛПС), с появлением соответствующего ему “амидного” пика с максимумом при 1635 см^{-1} .

В заключение необходимо заметить, что вместе с ростом числа публикаций, в которых метод ИКФС в разных вариантах с успехом применяется для исследования микроорганизмов и иных биологических объектов, нередко в работах встречаются неточности как методологического характера (их обычно легко различить по нехарактерной для данных объектов форме спектров и (или) относительной интенсивности типичных пиков [71], наличию сильного дублета CO_2 около 2350 см^{-1} (см. [72]), заметного, например, в работе [73], свидетельствующего о недостаточной продувке камеры спектрометра для удаления CO_2 и возможных сопутствующих паров воды [27], и др.), так и интерпретации спектроскопических дан-

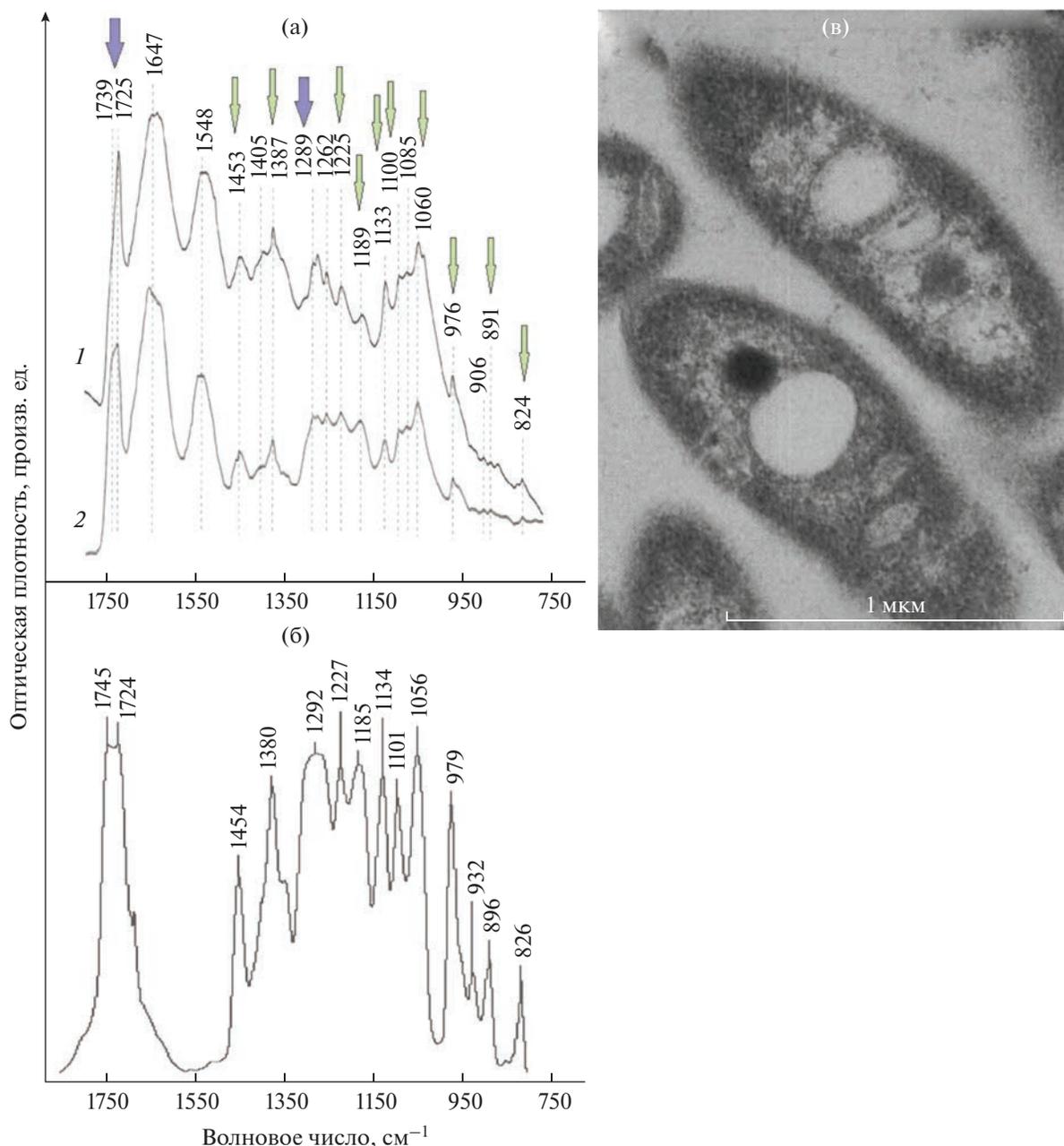


Рис. 6. ИК-спектры (а) сухой биомассы бактерии *Aquabacterium commune* (1) в виде биопленки, сформированной на поверхности нержавеющей стали в течение 100 ч, и (2) в виде планктонной культуры, выделенной из той же среды культивирования (измерения проведены методом микро-ИКФС в режиме отражения [45]); (б) тонкой пленки поли-3-гидроксибутирата (ПГБ), выделенного из биомассы бактерии *Azospirillum baldaniorum* Sp245 [66] (измерения проведены в режиме пропускания), а также (в) электронные микрофотографии клеток *Aquabacterium commune* (масштабная линейка 1 мкм) [77]. На рисунке (а) стрелочками показаны положения полос, соответствующих полосам ПГБ на рисунке (б); двумя более крупными темными стрелками обозначены области основных полос ПГБ, соответствующих колебаниям связей С=О (около 1740 см^{-1}) и С–О–С (около 1290 см^{-1}) сложноэфирного фрагмента, чувствительных к степени кристалличности ПГБ [66–68]. На рисунке (в) на изображениях клеток видны включения полифосфата (темные) и крупные гранулы полигидроксиалканоев (белые) [77]. (Рисунок подготовлен авторами с использованием данных, представленных в работах [45, 66, 77]).

ных. В качестве примера можно привести отнесение авторами работы [74] в ИК-спектре биопленки бактерии *Acinetobacter baumannii* аналогичного слабого дублета CO_2 при 2352 см^{-1} к “изоцианату”.

В ИК-спектрах выделенных авторами работы [75] образцов ПГБ и его сополимера с поли-3-гидроксиивалератом наряду с типичными полосами ПГА (в частности, наиболее интенсив-

ной полосой $\nu(\text{C}=\text{O})$ при 1729 см^{-1} присутствуют также интенсивные полосы амид-I и амид-II при ~ 1648 и 1547 см^{-1} , а также широкая интенсивная полоса в области $\nu(\text{O}-\text{H})$ ($\sim 3500-3000 \text{ см}^{-1}$). Эти данные указывают на очевидную недостаточную очистку биополимеров от биомассы клеток и (или) ее макрокомпонентов. Аналогичная ошибка допущена авторами работы [76], в которой в ИК-спектре, как указано в подписи к рисунку, выделенного из биомассы бактерии *Bacillus cereus* образца ПГБ имеются интенсивные полосы, характерные для белков (включая амид-I и амид-II при ~ 1634 и 1533 см^{-1}). При этом практически отсутствует полоса $\nu(\text{C}=\text{O})$ в области $\sim 1740 \text{ см}^{-1}$, что ставит под сомнение наличие “выделенного” авторами [76] биополимера в образце.

Авторы замечательного по информативности сравнительного исследования различных режимов измерения ИК-фурье-спектров образцов бактерии *Aquabacterium commune* [45] при интерпретации данных описывали асимметричную полосу поглощения $\nu(\text{C}=\text{O})$ значительной интенсивности в области $1739-1725 \text{ см}^{-1}$, сравнимой по величине с полосами белков (амид-I и амид-II), как отвечающую мембранным липидам и жирным кислотам. Такая интерпретация, на наш взгляд, не соответствует физиологическому составу клеток (в частности, содержанию липидов), поскольку полоса $\nu(\text{C}=\text{O})$ такой интенсивности в клетках бактерий наблюдается лишь при накоплении значительных количеств резервных сложных полиэфиров (ПГА) [3, 66–68]. В статье с первым описанием данной бактерии [77] упоминалось, что она содержала ПГА в качестве резервных биополимеров, причем на опубликованных в статье [77] микрофотографиях этой бактерии и других описанных видов *Aquabacterium* видны достаточно крупные множественные гранулы ПГА. (Отметим, что авторы работы [45] выращивали культуру *A. commune* на той же среде и в условиях, аналогичных указанному в работе [77], поэтому общий состав и морфология клеточной биомассы должны быть аналогичными.) Сравнение ИК-спектров сухих биомасс (биопленки и планктонной культуры) бактерии *A. commune* [45] и выделенного из клеток бактерии *Azospirillum baldaniorum* (ранее известна как *A. brasilense*) чистого образца ПГБ [66] (рис. 6а–6б) показывает, что все основные полосы, характерные для ПГБ (и других ПГА [65, 67]), присутствуют в спектрах бактериальных биомасс *A. commune* (кроме того, крупные гранулы ПГА видны на микрофотографиях клеток бактерии [77]; рис. 6в). При этом важно также подчеркнуть, что основные изменения формы полос на рис. 6а (спектры 1 и 2 биомасс *A. commune*) соответствуют двум основным областям колебаний ПГБ, чувствительным к степени его кристалличности (выделены на рис. 6а крупными темными стрелками).

В публикациях встречались, к сожалению, и более существенные ошибки. Так, в работах [78, 79] ИК-фурье-спектры биогенных наночастиц селена микробного происхождения, измеренные в режиме поглощения (с максимумами, направленными вверх), были представлены в координатах пропускания по оси ординат (с описанием минимумов на спектрах вместо пиков) и, соответственно, с неверной интерпретацией. Следует тем не менее заметить, что в обоих случаях были опубликованы исправления (соответственно [80, 81]).

Из приведенных сведений об имеющихся в литературе неточностях, допущенных при проведении измерений и интерпретации полученных данных, можно сделать следующие основные выводы. Поскольку метод ИКФС, особенно при наличии современных приборов и аксессуаров, зачастую не требует особо сложной пробоподготовки даже для микробиологических образцов, эта кажущаяся “простота” может отвлекать от необходимости строгого соблюдения рекомендуемых в руководствах [3, 27, 30] основных этапов подготовки прибора и образцов. Сам метод, однако, достаточно “коварен” – в том смысле, что при неправильных измерениях и (или) подготовке образцов ИК-спектр всегда удается получить, но он может не соответствовать реальной структуре и составу исследуемой системы. Тем не менее эти методологические нюансы достаточно просто учесть. Наиболее важной частью исследования после получения адекватных экспериментальных ИК-спектров является именно их интерпретация, требующая значительной квалификации, опыта и наблюдательности. Выше уже отмечались сложность и высокая информативность ИК-спектров биологических образцов, связанные как с возможным перекрытием областей (величин энергии) колебаний различных функциональных групп молекул, так и с их чувствительностью к межмолекулярным и внутримолекулярным взаимодействиям. Таким образом, при интерпретации данных важно принимать во внимание многозначность информации, заключенной в спектрах. При этом, разумеется, обязательно следует учитывать и наличие разных типов колебаний (валентные, различные типы деформационных, симметричные и асимметричные колебания и др.), что особенно важно для многоатомных функциональных групп. Эти “отпечатки” следует фиксировать в анализируемых спектрах с учетом их относительной интенсивности, которая может в значительных пределах меняться, в том числе в зависимости от межмолекулярных взаимодействий, состояния образца, условий его получения и т.д.

В настоящем мини-обзоре на отобранных авторами примерах из литературы, опубликован-

ных в основном в последние 10–15 лет, рассмотрена важность основных этапов пробоподготовки микробиологических образцов, и в первую очередь биомассы клеток и биопленок. Особо отмечены возможности изменения нативного состояния исследуемой системы при подготовке проб (высушивание, измельчение и др.). Таким образом, хотя метод ИКФС является неразрушающим (не изменяющим состав образца) и в значительной степени неинвазивным (не влияющим на его химическую и морфологическую структуру), важно соблюдать это правило также при отборе и подготовке образцов. Рассмотрены некоторые важные особенности интерпретации спектрохимических данных, возможности сравнительных количественных оценок содержания макрокомпонентов при анализе относительных интенсивностей характерных колебаний. Приведены примеры некоторых типичных методологических и аналитических неточностей и ошибок, встречающихся в литературе по изучению микробиологических объектов методом ИКФС, проанализированы их причины; даны рекомендации для обеспечения правильной подготовки и проведения ИК-спектроскопического биоанализа.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант 22-26-00142).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Norris K.P. Infra-red spectroscopy and its application to microbiology // *J. Hyg.* 1959. V. 57. № 3. P. 326. <https://doi.org/10.1017/S0022172400020192>
2. Naumann D., Helm D., Labischinski H. Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy // *Nature.* 1991. V. 351. № 6321. P. 81. <https://doi.org/10.1038/351081a0>
3. Naumann D. Infrared spectroscopy in microbiology / *Encyclopedia of Analytical Chemistry* / Ed. Meyers R.A. Wiley: Chichester, UK, 2000. P. 102. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a0117>
4. Franco-Duarte R., Kadam S., Kaushik K.S., Painuli S., Semwal P., Cruz-Martins N., Rodrigues C.F. Quick detection and confirmation of microbes in food and water / *Present Knowledge in Food Safety. A Risk-Based Approach Through the Food Chain* / Eds. Knowles M.E., Anelich L.E., Boobis A.R., Popping B. London: Acad. Press, 2023. Ch. 59. P. 893. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819470-6.00030-5>
5. Ramzan M., Raza A., un Nisa Z., Musharraf S.G. Recent studies on advance spectroscopic techniques for the identification of microorganisms: A review // *Arab. J. Chem.* 2023. V. 16. № 3. Article 104521. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.104521>
6. Sportelli M.C., Kranz C., Mizaikoff B., Cioffi N. Recent advances on the spectroscopic characterization of microbial biofilms: A critical review // *Anal. Chim. Acta.* 2022. V. 1195. Article 339433. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.339433>
7. Cheah Y.T., Chan D.J.C. A methodological review on the characterization of microalgal biofilm and its extracellular polymeric substances // *J. Appl. Microbiol.* 2022. V. 132. № 5. P. 3490. <https://doi.org/10.1111/jam.15455>
8. Xin Z., Chen J., Peng H. Advances in spectral techniques for detection of pathogenic microorganisms // *Zoonoses.* 2022. V. 2. Article 8. <https://doi.org/10.15212/ZOONOSES-2021-0027>
9. Fernández-Domínguez D., Guilayn F., Patureau D., Jimenez J. Characterising the stability of the organic matter during anaerobic digestion: A selective review on the major spectroscopic techniques // *Rev. Environ. Sci. Bio/Technol.* 2022. V. 21. P. 691. <https://doi.org/10.1007/s11157-022-09623-2>
10. Harrison J.P., Berry D. Vibrational spectroscopy for imaging single microbial cells in complex biological samples // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. Article 675. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00675>
11. Pan M., Zhu L., Chen L., Qiu Y., Wang J. Detection techniques for extracellular polymeric substances in biofilms: A review // *BioResources.* 2016. V. 11. № 3. P. 8092. <https://doi.org/10.15376/biores.11.3.8092-8115>
12. Jansson M.M., Kögler M., Hörrkö S., Ala-Kokko T., Rieppo L. Vibrational spectroscopy and its future applications in microbiology // *Appl. Spectrosc. Rev.* 2023. V. 58. № 2. P. 132. <https://doi.org/10.1080/05704928.2021.1942894>
13. Novais Â., Peixe L. Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) for food and water microbiology / *Application and Integration of Omics-Powered Diagnostics in Clinical and Public Health Microbiology* / Eds. Moran-Gilad J., Yagel Y. Cham: Springer, 2021. P. 191. https://doi.org/10.1007/978-3-030-62155-1_11
14. Chirman D., Pleshko N. Characterization of bacterial biofilm infections with Fourier transform infrared spectroscopy: A review // *Appl. Spectrosc. Rev.* 2021. V. 56. № 8–10. P. 673. <https://doi.org/10.1080/05704928.2020.1864392>
15. Novais Â., Freitas A.R., Rodrigues C., Peixe L. Fourier transform infrared spectroscopy: unlocking fundamentals and prospects for bacterial strain typing // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2019. V. 38. P. 427. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3431-3>
16. Quintelas C., Ferreira E.C., Lopes J.A., Sousa C. An overview of the evolution of infrared spectroscopy applied to bacterial typing // *Biotechnol. J.* 2018. V. 13. № 1. Article 1700449. <https://doi.org/10.1002/biot.201700449>
17. Faghihzadeh F., Anaya N.M., Schiffman L.A., Oyanedel-Craver V. Fourier transform infrared spectroscopy to assess molecular-level changes in microorganisms exposed to nanoparticles // *Nanotechnol. Environ. Eng.* 2016. V. 1. Article 1. <https://doi.org/10.1007/s41204-016-0001-8>
18. Faehelebom K.M., Saleh A., Al-Tabakha M.M.A., Ashames A.A. Recent applications of quantitative analytical FTIR spectroscopy in pharmaceutical, biomedical, and clinical fields: A brief review // *Rev. Anal. Chem.* 2022. V. 41. № 1. P. 21. <https://doi.org/10.1515/revac-2022-0030>
19. Baiz C.R., Blasiak B., Bredenbeck J., Cho M., Choi J.-H., Corcelli S.A., Dijkstra A.G., Feng C.-J., Garrett-Roe S., Ge N.-H., Hanson-Heine M.W.D., Hirst J.D., Jansen T.L.C., Kwac K., Kubarych K.J., Londergan C.H.,

- Maekawa H., Reppert M., Saito S., Roy S., Skinner J.L., Stock G., Straub J.E., Thielges M.C., Tominaga K., Tokmakoff A., Torii H., Wang L., Webb L.J., Zanni M.T.* Vibrational spectroscopic map, vibrational spectroscopy, and intermolecular interaction // *Chem. Rev.* 2020. V. 120. № 15. P. 7152.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00813>
20. *Yang S., Zhang Q., Yang H., Shi H., Dong A., Wang L., Yu S.* Progress in infrared spectroscopy as an efficient tool for predicting protein secondary structure // *Int. J. Biol. Macromol.* 2022. V. 206. P. 175.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.02.104>
21. *Lorenz-Fonfria V.A.* Infrared difference spectroscopy of proteins: From bands to bonds // *Chem. Rev.* 2020. V. 120. № 7. P. 3466.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00449>
22. *Ganim Z., Chung H.S., Smith A.W., DeFlores L.P., Jones K.C., Tokmakoff A.* Amide I two-dimensional infrared spectroscopy of proteins // *Acc. Chem. Res.* 2008. V. 41. № 3. P. 432.
<https://doi.org/10.1021/ar700188n>
23. *Barth A.* Infrared spectroscopy of proteins // *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Bioenergetics.* 2007. V. 1767. № 9. P. 1073.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.06.004>
24. *Tatulian S.A.* Attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy: A method of choice for studying membrane proteins and lipids // *Biochemistry.* 2003. V. 42. № 41. P. 11898.
<https://doi.org/10.1021/bi034235>
25. *Wiercigroch E., Szafraniec E., Czamara K., Pacia M.Z., Majzner K., Kochan K., Kaczor A., Baranska M., Malek K.* Raman and infrared spectroscopy of carbohydrates: A review // *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 2017. V. 185. P. 317.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.05.045>
26. *Lewis R.N.A.H., McElhaney R.N.* Membrane lipid phase transitions and phase organization studied by Fourier transform infrared spectroscopy // *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Biomembranes.* 2013. V. 1828. № 10. P. 2347.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.10.018>
27. *Yang H., Shi H., Feng B., Wang L., Chen L., Alvarez-Ordóñez A., Zhang L., Shen H., Zhu J., Yang S., Ding C., Prietod M., Yang F., Yu S.* Protocol for bacterial typing using Fourier transform infrared spectroscopy // *STAR Protocols.* 2023. V. 4. № 2. Article 102223.
<https://doi.org/10.1016/j.xpro.2023.102223>
28. *Morais C.L.M., Paraskevaidi M., Cui L., Fullwood N.J., Isabelle M., Lima K.M.G., Martin-Hirsch P.L., Sreedhar H., Trevisan J., Walsh M.J., Zhang D., Zhu Y.-G., Martin F.L.* Standardization of complex biologically derived spectrochemical datasets // *Nat. Protoc.* 2019. V. 14. P. 1546.
<https://doi.org/10.1038/s41596-019-0150-x>
29. *Baker M.J., Trevisan J., Bassan P., Bhargava R., Butler H.J., Dorling K.M., Fielden P.R., Fogarty S.W., Fullwood N.J., Heys K.A., Hughes C., Lasch P., Martin-Hirsch P.L., Obinaju B., Sockalingum G.D., Sulé-Suso J., Strong R.J., Walsh M.J., Wood B.R., Gardner P., Martin F.L.* Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials // *Nat. Protoc.* 2014. V. 9. P. 1771.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2014.110>
30. *Ojeda J.J., Dittrich M.* Fourier transform infrared spectroscopy for molecular analysis of microbial cells / *Microbial Systems Biology: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology.* V. 881 / Ed. Navid A. Totowa, NJ, USA: Humana Press, 2012. Ch. 8. P. 187.
https://doi.org/10.1007/978-1-61779-827-6_8
31. *Martin F.L., Kelly J.G., Llabjani V., Martin-Hirsch P.L., Patel I.I., Trevisan J., Fullwood N.J., Walsh M.J.* Distinguishing cell types or populations based on the computational analysis of their infrared spectra // *Nat. Protoc.* 2010. V. 5. P. 1748.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2010.133>
32. *Bacterial Amyloids: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology.* V. 2538 / Eds. Arluison V., Wien F., Marcoleta A. Totowa, NJ, USA: Humana Press, 2022. 337 p.
<https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2529-3>
33. *Bridelli M.G.* Fourier transform infrared spectroscopy in the study of hydrated biological macromolecules / *Fourier Transforms – High-tech Application and Current Trends* / Eds. Nikolić G.S., Cakić M.D., Cvetković D.J. Rijeka, Croatia: InTech, 2017. P. 191.
<https://doi.org/10.5772/66576>
34. *Kristiansson O., Lindgren J.* Infrared spectroscopic studies of concentrated aqueous electrolyte solutions // *J. Phys. Chem.* 1991. V. 95. № 3. P. 1488.
<https://doi.org/10.1021/j100156a085>
35. *De Meutter J., Goormaghtigh E.* FTIR imaging of protein microarrays for high throughput secondary structure determination // *Anal. Chem.* 2021. V. 93. № 8. P. 3733.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c03677>
36. *Wilcox K.E., Blanch E.W., Doig A.J.* Determination of protein secondary structure from infrared spectra using partial least-squares regression // *Biochemistry.* 2016. V. 55. № 27. P. 3794.
<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00403>
37. *Kafle B., Böcker U., Wubshet S.G., Dankel K., Mage I., Marion O., Afseth N.K.* Fourier-transform infrared spectroscopy for characterization of liquid protein solutions: A comparison of two sampling techniques // *Vibr. Spectrosc.* 2023. V. 124. Article 103490.
<https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2022.103490>
38. *Shi H., Sun J., Han R., Ding C., Hu F., Yu S.* The strategy for correcting interference from water in Fourier transform infrared spectrum based bacterial typing // *Talanta.* 2020. V. 208. Article 120347.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120347>
39. *Gordon S.H., Harry-O'kuru R.E., Mohamed A.A.* Elimination of interference from water in KBr disk FT-IR spectra of solid biomaterials by chemometrics solved with kinetic modeling // *Talanta.* 2017. V. 174. P. 587.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.06.043>
40. *Rahmelow K., Hubner W.* Infrared spectroscopy in aqueous solution: Difficulties and accuracy of water subtraction // *Appl. Spectrosc.* 1997. V. 51. № 2. P. 160.
<https://opg.optica.org/as/abstract.cfm?URI=as-51-2-160>
41. *Holman H.-Y.N., Miles R., Hao Z., Wozzi E., Anderson L.M., Yang H.* Real-time chemical imaging of bacterial activity in biofilms using open-channel microfluidics and synchrotron FTIR spectromicroscopy // *Anal. Chem.* 2009. V. 81. № 20. P. 8564.
<https://doi.org/10.1021/ac9015424>

42. Kamnev A.A. FTIR spectroscopic studies of bacterial cellular responses to environmental factors, plant-bacterial interactions and signalling // *Spectroscopy*. 2008. V. 22. P. 83.
<https://doi.org/10.3233/SPE-2008-0329>
43. Kamnev A.A., Sadovnikova J.N., Tarantilis P.A., Polissiou M.G., Antonyuk L.P. Responses of *Azospirillum brasilense* to nitrogen deficiency and to wheat lectin: A diffuse reflectance infrared Fourier transform (DRIFT) spectroscopic study // *Microb. Ecol.* 2008. V. 56. № 4. P. 615.
<https://doi.org/10.1007/s00248-008-9381-z>
44. Tugarova A.V., Sheludko A.V., Dyatlova Yu.A., Filip'echeva Yu.A., Kamnev A.A. FTIR spectroscopic study of biofilms formed by the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 and its mutant *Azospirillum brasilense* Sp245.1610 // *J. Mol. Struct.* 2017. V. 1140. P. 142.
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.12.063>
45. Ojeda J.J., Romero-González M.E., Banwart S.A. Analysis of bacteria on steel surfaces using reflectance micro-Fourier transform infrared spectroscopy // *Anal. Chem.* 2009. V. 81. P. 6467.
<https://doi.org/10.1021/ac900841c>
46. Boza Y., Barbin D., Scamparini A.R.P. Effect of spray-drying on the quality of encapsulated cells of *Beijerinckia* sp. // *Process Biochem.* 2004. V. 39. № 10. P. 1275.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.06.002>
47. Hlaing M.M., Wood B.R., McNaughton D., Ying D., Dumsday G., Augustin M.A. Effect of drying methods on protein and DNA conformation changes in *Lactobacillus rhamnosus* GG cells by Fourier transform infrared spectroscopy // *J. Agric. Food Chem.* 2017. V. 65. № 8. P. 1724.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b05508>
48. Alsvéd M., Holm S., Christiansen S., Smidt M., Rosati B., Ling M., Boesen T., Finster K., Bilde M., Löndahl J., Šantl-Temkiv T. Effect of aerosolization and drying on the viability of *Pseudomonas syringae* cells // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. Article 3086.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03086>
49. Shelud'ko A.V., Mokeev D.I., Evstigneeva S.S., Filip'echeva Yu.A., Burov A.M., Petrova L.P., Katsy E.I. Suppressed biofilm formation efficiency and decreased biofilm resistance to oxidative stress and drying in an *Azospirillum brasilense* *ahpC* mutant // *Microbiology*. 2021. V. 90. P. 56.
<https://doi.org/10.1134/S0026261721010100>
50. Morgan C.A., Herman N., White P.A., Vesey G. Preservation of micro-organisms by drying; A review // *J. Microbiol. Methods*. 2006. V. 66. № 2. P. 183.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.02.017>
51. García A.H. Anhydrobiosis in bacteria: from physiology to applications // *J. Biosci.* 2011. V. 36. № 5. P. 939.
<https://doi.org/10.1007/s12038-011-9107-0>
52. Sahu P.K., Gupta A., Singh M., Mehrotra P., Brahma-prakash G.P. Bioformulation and fluid bed drying: A new approach towards an improved biofertilizer formulation / *Eco-friendly Agro-biological Techniques for Enhancing Crop Productivity* / Eds. Sengar R., Singh A. Singapore: Springer, 2018. P. 47.
https://doi.org/10.1007/978-981-10-6934-5_3
53. França M.B., Panek A.D., Eleutherio E.C.A. Oxidative stress and its effects during dehydration // *Compar. Biochem. Physiol. Part A: Mol. Integr. Physiol.* 2007. V. 146. № 4. P. 621.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.02.030>
54. Kamnev A.A., Tugarova A.V., Shchelochkov A.G., Kovács K., Kuzmann E. Diffuse reflectance infrared Fourier transform (DRIFT) and Mössbauer spectroscopic study of *Azospirillum brasilense* Sp7: Evidence for intracellular iron(II) oxidation in bacterial biomass upon lyophilisation // *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 2020. V. 229. Article 117970.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117970>
55. Камнев А.А., Тугарова А.В. Биоаналитические применения мессбауэровской спектроскопии // *Успехи химии*. 2021. Т. 90. № 11. С. 1415. (Kamnev A.A., Tugarova A.V. Bioanalytical applications of Mössbauer spectroscopy // *Russ. Chem. Rev.* 2021. V. 90. № 11. P. 1415.
<https://doi.org/10.1070/RCR5006>
<https://doi.org/10.1070/RCR5006?locatt=label:RUSSIAN>
56. Спицын А.Н., Уткин Д.В., Кузнецов О.С., Ерохин П.С., Осина Н.А., Кочубей В.И. Применение оптических технологий для изучения и идентификации микроорганизмов (обзор) // *Опт. спектроск.* 2021. Т. 129. № 1. С. 100. (Spitsyn A.N., Utkin D.V., Kuznetsov O.S., Erokhin P.S., Osina N.A., Kochubei V.I. Application of optical techniques to investigation and identification of microorganisms: A review // *Opt. Spectrosc.* 2021. V. 129. № 1. P. 135.
<https://doi.org/10.1134/S0030400X21010057>
<https://doi.org/10.21883/OS.2021.01.50446.200-20>
57. Kamnev A.A., Tugarova A.V., Tarantilis P.A., Gardiner P.H.E., Polissiou M.G. Comparing poly-3-hydroxybutyrate accumulation in *Azospirillum brasilense* strains Sp7 and Sp245: The effects of copper(II) // *Appl. Soil Ecol.* 2012. V. 61. P. 213.
<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.10.020>
58. Sedlacek P., Slaninova E., Enev V., Koller M., Nebesárova J., Marova I., Hrubanova K., Krzyzanek V., Samek O., Obruca S. What keeps polyhydroxyalkanoates in bacterial cells amorphous? A derivation from stress exposure experiments // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2019. V. 103. P. 1905.
<https://doi.org/10.1007/s00253-018-09584-z>
59. Kamnev A.A., Dyatlova Yu.A., Kenzhegulov O.A., Fedonenko Yu.P., Evstigneeva S.S., Tugarova A.V. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of biofilms formed by the rhizobacterium *Azospirillum baldaniorum* Sp245: Aspects of methodology and matrix composition // *Molecules*. 2023. V. 28. № 4. Article 1949.
<https://doi.org/10.3390/molecules28041949>
60. Kamnev A.A., Dyatlova Yu.A., Kenzhegulov O.A., Vladimirova A.A., Mamchenkova P.V., Tugarova A.V. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic analyses of microbiological samples and biogenic selenium nanoparticles of microbial origin: Sample preparation effects // *Molecules*. 2021. V. 26. № 4. Article 1146.
<https://doi.org/10.3390/molecules26041146>
61. Yang H., Yang S., Kong J., Dong A., Yu S. Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy // *Nat. Protoc.* 2015. V. 10. P. 382.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2015.024>
62. Skvortsova P., Valiullina Yu., Baranova N., Faizullin D., Zuev Yu., Ermakova E. Spectroscopic study of antimi-

- crobial peptides: Structure and functional activity // Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc. 2022. V. 264. Article 120273.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.120273>
63. Mayerhöfer T.G., Pahlow S., Ivanovski V., Popp J. Dispersion related coupling effects in IR spectra on the example of water and Amide I bands // Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc. 2023. V. 288. Article 122115.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.122115>
64. Volova T.G. Polyhydroxyalkanoates — Plastic Materials of the 21st Century: Production, Properties, Application. New York, NY, USA: Nova Science Pub., 2004. 282 p.
65. Волова Т.Г., Жила Н.О., Шишацкая Е.И., Миронов П.В., Васильев А.Д., Суковатый А.Г., Sinskey A.J. Физико-химические свойства полигидроксиалканоев различного химического строения // Высокомолекул. соед. Сер. А. 2013. Т. 55. № 7. С. 775. (Volova T.G., Zhila N.O., Shishatskaya E.I., Mironov P.V., Vasil'ev A.D., Sukovaty A.G., Sinskey A.J. The physicochemical properties of polyhydroxyalkanoates with different chemical structures // Polym. Sci. Ser. A. 2013. V. 55. P. 427.
<https://doi.org/10.1134/S0965545X13070080>
<https://doi.org/10.7868/S0507547513070210>
66. Kamnev A.A., Tugarova A.V., Dyatlova Yu.A., Taranilis P.A., Grigoryeva O.P., Fainleib A.M., De Luca S. Methodological effects in Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy: Implications for structural analyses of biomacromolecular samples // Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc. 2018. V. 193. P. 558.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.12.051>
67. Kansiz M., Domínguez-Vidal A., McNaughton D., Lendl B. Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy for monitoring and determining the degree of crystallization of polyhydroxyalkanoates (PHAs) // Anal. Bioanal. Chem. 2007. V. 388. P. 1207.
<https://doi.org/10.1007/s00216-007-1337-5>
68. Tugarova A.V., Dyatlova Yu.A., Kenzhegulov O.A., Kamnev A.A. Poly-3-hydroxybutyrate synthesis by different *Azospirillum brasilense* strains under varying nitrogen deficiency: A comparative in-situ FTIR spectroscopic analysis // Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc. 2021. V. 252. Article 119458.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.119458>
69. Pavan F.A., Junqueira T.L., Watanabe M.D.B., Bonomi A., Quines L.K., Schmidell W., de Aragao G.M.F. Economic analysis of polyhydroxybutyrate production by *Cupriavidus necator* using different routes for product recovery // Biochem. Eng. J. 2019. V. 146. P. 97.
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.03.009>
70. Sigida E.N., Kokoulin M.S., Dmitrenok P.S., Grinev V.S., Fedonenko Yu.P., Konnova S.A. The structure of the O-specific polysaccharide and lipid A of the type strain *Azospirillum rugosum* DSM-19657 // Russ. J. Bioorg. Chem. 2020. V. 46. № 1. P. 60.
<https://doi.org/10.1134/S1068162020010112>
71. Younis U., Rahi A.A., Danish S., Ali M.A., Ahmed N., Datta R., Fahad S., Holatko J., Hammerschmidt T., Brtnicky M., Zarei T., Baazeem A., El Sabagh A., Glick B.R. Fourier transform infrared spectroscopy vibrational bands study of *Spinacia oleracea* and *Trigonella corniculata* under biochar amendment in naturally contaminated soil // PLoS ONE. 2021. V. 16. № 6. Article e0253390.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253390>
72. Carbon dioxide / NIST Chemistry WebBook. <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C124389&Type=IR-SPEC&Index=0#IR-SPEC> (07.04.2023)
73. Huq M.A. Green synthesis of silver nanoparticles using *Pseudoduganella eburnea* MAHUQ-39 and their antimicrobial mechanisms investigation against drug resistant human pathogens // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 4. Article 1510.
<https://doi.org/10.3390/ijms21041510>
74. Yang Q., Olaiya K., Andrew F.P., Ajibade P.A., Ajunwa O.M., Marsili E. Assessment of physiological and electrochemical effects of a repurposed zinc dithiocarbamate complex on *Acinetobacter baumannii* biofilms // Sci. Rep. 2022. V. 12. № 1. Article 11701.
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-16047-z>
75. Das R., Pal A., Paul A.K. Optimization of process parameters for production of poly(3-hydroxybutyrate) by *Bacillus pumilus* AHSD 04, a seed borne endophyte of oleaginous plant *Arachis hypogaea* L. // Biointerf. Res. Appl. Chem. 2022. V. 12. № 4. P. 5280.
<https://doi.org/10.33263/BRIAC124.52805295>
76. Narayanan M., Kandasamy G., Murali P., Kandasamy S., Ashokkumar V., Nasif O., Pugazhendhi A. Optimization and production of polyhydroxybutyrate from sludge by *Bacillus cereus* categorized through FT-IR and NMR analyses // J. Environ. Chem. Eng. 2021. V. 9. № 1. Article 104908.
<https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104908>
77. Kalmbach S., Manz W., Wecke J., Szewzyk U. *Aquabacterium* gen. nov., with description of *Aquabacterium citratiphilum* sp. nov., *Aquabacterium parvum* sp. nov. and *Aquabacterium commune* sp. nov., three *in situ* dominant bacterial species from the Berlin drinking water system // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 1999. V. 49. № 2. P. 769.
<https://doi.org/10.1099/00207713-49-2-769>
78. Wang Y., Shu X., Zhou Q., Fan T., Wang T., Chen X., Li M., Ma Y., Ni J., Hou J., Zhao W., Li R., Huang S., Wu L. Selenite reduction and the biogenesis of selenium nanoparticles by *Alcaligenes faecalis* Se03 isolated from the gut of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19. № 9. Article 2799.
<https://doi.org/10.3390/ijms19092799>
79. Wang Y., Shu X., Hou J., Lu W., Zhao W., Huang S., Wu L. Selenium nanoparticle synthesized by *Proteus mirabilis* YC801: an efficacious pathway for selenite biotransformation and detoxification // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19. № 12. Article 3809.
<https://doi.org/10.3390/ijms19123809>
80. Wang Y., Shu X., Zhou Q., Fan T., Wang T., Chen X., Li M., Ma Y., Ni J., Hou J., Zhao W., Li R., Huang S., Wu L. Correction: Wang, Y.T., et al. Selenite reduction and the biogenesis of selenium nanoparticles by *Alcaligenes faecalis* Se03 isolated from the gut of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 2799 // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 4. Article 1294.
<https://doi.org/10.3390/ijms21041294>
81. Wang Y., Shu X., Hou J., Lu W., Zhao W., Huang S., Wu L. Correction: Wang Y.T. et al. Selenium nanoparticle synthesized by *Proteus mirabilis* YC801: An efficacious pathway for selenite biotransformation and detoxification. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 3809 // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 7. Article 2638.
<https://doi.org/10.3390/ijms21072638>