

На правах рукописи



Дятлова Юлия Анатольевна

**МЕТОД ИК-ФУРЬЕ-СПЕКТРОСКОПИИ В ИЗУЧЕНИИ
ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ АСПЕКТОВ СУЩЕСТВОВАНИЯ
БАКТЕРИЙ ВИДОВ
*AZOSPIRILLUM BRASILENSE И AZOSPIRILLUM BALDANIORUM***

1.5.2. Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Саратов – 2022

Работа выполнена в лаборатории биохимии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук» (ИБФРМ РАН), г. Саратов.

Научный руководитель: Тугарова Анна Владимировна, кандидат биологических наук

Официальные оппоненты: **Феофанов Алексей Валерьевич**, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук
Исмаилов Анвар Джураевич, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физиологии и биохимии кафедры микробиологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский федеральный университет», г. Красноярск

Защита диссертации состоится «__» _____ 2022 г. в 14 часов 00 минут на заседании диссертационного совета 24.1.038.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук по адресу: 119334, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра химической физики им. Н.Н. Семёнова Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, Ленинский проспект, д. 38, и на сайте: https://biochemphysics.ru/assets/uploads/Диссертация_Дятлова.pdf

Автореферат разослан «__» _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета 24.1.038.01,
кандидат химических наук



Л.И. Мазалецкая

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Одним из наиболее распространенных инструментальных методов во многих областях исследований является ИК-фурье-спектроскопия (ИКФС). Метод основан на регистрации колебательных переходов групп атомов при непосредственном поглощении веществом ИК излучения. Благодаря своей информативности, применимости к широкому спектру образцов, находящихся в различных физиологических состояниях, малом времени измерений и неинвазивности ИКФС представляет собой эффективный метод качественного и количественного анализа различных видов биологических объектов. В последние десятилетия всё большую популярность ИКФС приобретает в различных областях микробиологии. Большое количество статей, опубликованных за это время, показывают, что ИКФС может использоваться для быстрой дифференциации и идентификации микроорганизмов, анализа клеточного метаболизма уже известных бактериальных культур, идентификации отдельных внутриклеточных метаболитов и др. [1]. Однако, несмотря на распространенность метода и наличие баз данных спектров для идентификации и дифференциации различных видов бактерий, актуальной проблемой до настоящего момента является разработка оптимальной методики пробоподготовки различных микробиологических образцов и алгоритма анализа получаемых ИК-спектров для биоаналитического применения ИКФС.

В естественных условиях обитания бактерии, как правило, существуют в виде биопленок и постоянно находятся под воздействием внешних факторов, в том числе – стрессовых, к которым относятся: недостаток питательных веществ, негативные физические, химические и/или биологические факторы. Для адаптации к ним бактерии выработали множество защитных механизмов, одним из которых является накопление резервных веществ, таких как, например, полигидроксиалканоаты (ПГА) [2]. Одним из наиболее изученных ПГА является поли-3-гидроксибутират (ПГБ). К синтезу ПГБ способны бактерии рода *Azospirillum*, представляющие собой грам-отрицательные бактерии, многие из которых образуют ассоциации с корнями различных растений [3]. Естественной средой обитания для большинства бактерий рода *Azospirillum* является почва, где эти бактерии колонизируют корни растений и, в ряде случаев, их межклеточные пространства, существуя в виде сложных биопленок [4]. Бактерии рода *Azospirillum* используются в сельскохозяйственной биотехнологии в качестве бактериальных удобрений, т.к. за счет разных механизмов, таких как синтез фитогормонов, стимулирование роста корневой системы и др., способны оказывать позитивное действие на рост и развитие растений [3].

Таким образом, задача изучения бактерий рода *Azospirillum* методом ИКФС, в том числе в режиме пропускания, важна: (1) для разработки и оптимизации алгоритма анализа ИК-спектров и принципов пробоподготовки, применимых к различным микробиологическим объектам (планктонная культура, биопленка, отдельно выделенные макрокомпоненты бактериальных клеток); (2) для понимания физиологических изменений, происходящих в бактериальных клетках в ответ на стрессовые условия, в том числе – существенных для использования азоспирилл в качестве биоудобрений, с целью повышения их эффективности.

Степень разработанности темы исследования. Первые работы, посвященные ИК-спектроскопии как используемому в микробиологических исследованиях методу, в частности, для идентификации и классификации бактерий, были опубликованы еще в 50-х гг. XX века [5]. Однако на тот момент несовершенство приборов и трудоемкость измерений ограничивали ее применение. К 90-м гг. XX века стали появляться более чувствительные, доступные и удобные в

использовании ИК-фурье-спектрометры со значительно более высоким разрешением, что позволило эффективно использовать ИКФС в микробиологических исследованиях.

К настоящему времени накоплен обширный пул исследований, посвященных идентификации и дифференциации различных видов и штаммов микроорганизмов методом ИКФС. В 1985 г. в работе Д. Науманна [6] были предприняты первые попытки стандартизировать и создать протокол для анализа ИК-спектров микроорганизмов с последующей его доработкой [7]. Помимо дифференциации и идентификации, метод ИКФС активно используется при качественном и количественном анализе как общего макрокомпонентного состава [1], так и при анализе отдельных компонентов бактериальных клеток, таких как белковые структуры [8], различные углеводы [9], липиды [10], липополисахариды [11] и др. [12].

Однако, несмотря на большое количество накопленных данных, к настоящему моменту использование данного метода для решения различных исследовательских и прикладных биоаналитических задач ограничено вследствие: (1) отсутствия стандартизированных методик пробоподготовки, которые были бы применимы ко всему спектру микробиологических образцов; (2) сложности анализа ИК-спектров микробиологических объектов и необходимости корректного использования различных математических и статистических подходов. Эти сложности связаны в первую очередь с высокой чувствительностью ИКФС, в том числе – к различного рода межмолекулярным и внутримолекулярным взаимодействиям, которые, повышая информативность ИК-спектров, также во многом усложняют их ввиду появления соответствующих сдвигов полос поглощения определенных функциональных групп, участвующих во взаимодействиях, или их расщепления.

Цель работы: разработка методологии ИКФС в режиме пропускания и ее использование для изучения особенностей метаболизма в оптимальных и стрессовых условиях бактерий видов *A. brasilense* и *A. baldaniorum*, находящихся в разном физиологическом состоянии. В соответствии с целью исследования были поставлены следующие задачи:

1. Разработать методику пробоподготовки и алгоритм анализа ИК-спектров бактериальных образцов, находящихся в разных физиологических состояниях (планктонная культура, биопленка), измеренных в режиме пропускания.
2. Провести сравнительный анализ синтеза ПГБ бактериями штаммов *A. baldaniorum* Sp245, *A. brasilense* Sp7 и *A. brasilense* Cd, культивируемых при трофическом стрессе разной степени интенсивности.
3. Изучить планктонные культуры и биопленки, образованные бактериями вида *A. baldaniorum*.

Научная новизна. Предложена оригинальная методика пробоподготовки бактериальных образцов, находящихся в разных физиологических состояниях; предложен алгоритм анализа ИК-спектров при изучении их методом ИК-фурье-спектроскопии. Показано, что использование полярной матрицы (KBr) для пробоподготовки сухой бактериальной биомассы приводит не только к сдвигу ряда полос полярных функциональных групп биомакромолекул в ИК-спектрах, но и индуцирует кристаллизацию неупорядоченной фракции внутриклеточного сложного полиэфира (ПГБ). Для образцов ПГБ показана зависимость степени его упорядоченности от толщины пленки образца: для более толстых пленок полимера характерно увеличение доли аморфной структуры, что связано с нарушением дальнего порядка из-за присутствия в образце молекул связанной воды. Впервые с применением метода ИКФС проведено сравнительное изучение планктонных культур и биопленок, образованных бактериями штамма *A. baldaniorum* Sp245 и его мутантом. Установлены различия между диким штаммом и его мутантом в обоих

физиологических состояниях. Показано влияние продуктов генов липидного метаболизма (*fabG1* и *fabH1*) на процессы накопления ПГБ на примере штамма-мутанта *A. baldaniorum* Sp245.1610 и его комплементированных производных. С применением метода ИКФС изучены особенности накопления ПГБ бактериями штаммов *A. baldaniorum* Sp245 и *A. brasilense* Sp7 и Cd при трофическом стрессе различной степени интенсивности.

Научно-практическая значимость исследования. Предложены методика пробоподготовки, подходящая для использования при изучении разнообразных бактериальных образцов методом ИКФС в режиме пропускания, и алгоритм оценки относительного содержания различных макрокомпонентов в бактериальных клетках. Изучен метаболический отклик бактерий рода *Azospirillum* на трофический стресс. На примере штамма *A. baldaniorum* Sp245 и комплементированных производных его мутанта *A. baldaniorum* Sp245.1610 показано влияние продуктов генов липидного метаболизма *fabG1* и *fabH1* на синтез ПГБ, что существенно для устойчивости бактерий в неблагоприятных условиях. Полученные результаты способствуют лучшему пониманию функционирования защитных механизмов бактерий рода *Azospirillum* и могут быть полезны при разработке стратегии использования азоспирилл в агробиотехнологии, а также при создании новых рекомбинантных штаммов азоспирилл, обладающих большей устойчивостью к разнообразным негативным факторам.

Результаты диссертационной работы использованы при составлении учебно-методического пособия «Методы изучения формирования биопленок почвенными бактериями, стимулирующими рост растений» / Составители: Мокеев Д.И., Евстигнеева С.С., Телешева Е.М., Дятлова Ю.А., Шелудько А.В., Широков А.А., Матора Л.Ю., Тугарова А.В., Камнев А.А., Филиппчева Ю.А., Петрова Л.П. / Под ред. Федоненко Ю.П. – Саратов, 2021. – 40 с. Данное пособие, рекомендованное к печати Ученым советом ИБФРМ РАН, предназначено для студентов и аспирантов химического и биологического профиля и используется при обучении студентов на биологическом факультете Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского и в ИБФРМ РАН.

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработаны оптимальная пробоподготовка бактериальных культур в различных физиологических состояниях (планктонная культура и биопленки) для измерения методом ИКФС и алгоритм расчета относительного содержания различных макрокомпонентов на основании соотношения площадей полос на ИК-спектрах (на примере ПГБ). Использование полярной матрицы (KBr) при подготовке образцов сухой бактериальной биомассы индуцирует кристаллизацию неупорядоченной фракции внутриклеточного ПГБ.

2. Степень упорядоченности выделенного из бактериальной биомассы ПГБ зависит от толщины подготовленной пленки образца и связана с наличием молекул воды, влияющих на состояние слабых водородных связей между цепями ПГБ в объеме пленки.

3. Определены условия накопления наибольшего количества ПГБ штаммами *A. brasilense* Sp7, *A. brasilense* Cd и *A. baldaniorum* Sp245, культивируемыми в течение 30 сут при разной степени трофического стресса.

4. Продукты генов липидного метаболизма *fabG1* и *fabH1* влияют на процессы синтеза и накопления ПГБ клетками азоспирилл.

Личный вклад автора. Все экспериментальные данные и выводы, представленные в диссертационной работе, были получены либо лично автором, либо при его непосредственном участии на всех этапах исследования, включая планирование и проведение экспериментов, анализ и обсуждение полученных данных, а также обработку, оформление и публикацию результатов.

Достоверность и обоснованность результатов обеспечена тем, что в работе использованы современные методы исследования и сертифицированное научно-исследовательское оборудование; данные экспериментальных измерений статистически обработаны с помощью общепринятой методологии.

Апробация работы. Материалы были представлены и обсуждались на 19 научных мероприятиях – 13 международных (или с международным участием) и 6 российских: Региональных научных конференциях «Исследования молодых ученых и студентов в биологии и экологии» (Саратов, 15–18 апреля 2013 г.; 20–24 апреля 2015 г.), XXVII Зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 9–12 февраля 2015 г.), International Turkish Congress on Molecular Spectroscopy (Анталия, Турция, 13–18 сентября, 2015 г.), Всероссийской молодежной научной конференции с международным участием «Биотехнология, биоинформатика и геномика растений и микроорганизмов» (Томск, 26–28 апреля 2016 г.), XIII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук» (Томск, 26–29 апреля 2016 г.), 33rd European Congress on Molecular Spectroscopy (EUCMOS, Сегед, Венгрия, 30 июля – 04 августа 2016 г.), VIII Всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (Саратов, 26–30 сентября 2016 г.), Международной научно-практической конференции «Вавиловские чтения – 2016» (Саратов, 24–25 ноября 2016 г.), 2nd Caparica Christmas Conference on Sample Treatment (Кошта-да-Капарика, Португалия, 5–7 декабря 2016 г.), Colloquium Spectroscopicum Internationale XL (Пиза, Италия, 11–16 июня 2017 г.), I Российском микробиологическом конгрессе (Пушино, 17–18 октября 2017 г.), Втором междисциплинарном молодежном научном форуме с международным участием «Новые материалы» (Москва, 21–24 ноября 2017 г.), Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов–2018» (Москва, 9–13 апреля 2018 г.), Международной научной конференции «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» PLAMIC 2018 (Уфа, 13–17 июня 2018 г.), 43rd FEBS Congress “Biochemistry Forever” (Прага, Чешская Республика, 7–12 июля 2018 г.), 18th European Congress on Biotechnology (Женева, Швейцария, 1–4 июля 2018 г.), Colloquium Spectroscopicum Internationale XLI (Мехико, Мексика, 9–14 июня 2019 г.)

Связь работы с научными программами. Отдельные этапы работы выполнены в соответствии с Госзаданием в рамках тем: «Роль биомакромолекул и низкомолекулярных веществ в механизмах адаптации растительно-микробных ассоциаций в составе антропобиоценозов к условиям аридного климата» (№ ГР 01201359049, 2013–2017 гг.); «Структурно-функциональная характеристика биополимеров и надмолекулярных комплексов ризосферных бактерий, определяющих формирование ассоциативного симбиоза как формы адаптации к условиям обитания». (№ ГР АААА-А17-117102740102-2, 2018 г.); «Выявление структурно-функциональных особенностей биополимеров и надмолекулярных комплексов ризосферных бактерий, детерминирующих образование ассоциативного симбиоза как формы адаптации к условиям обитания» (№ ГР АААА-А19-119011890162-3, 2019–2021 гг.).

Диссертационная работа выполнялась при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 17-08-01696-а) и Российского научного фонда (грант № 22-26-00142).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 27 печатных работ, из них: 9 публикаций представлено в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ, из которых 8 – в журналах, входящих в международные базы данных и системы цитирования Web

of Science и Scopus; 18 публикаций в российских и международных сборниках трудов и материалов научных конференций.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, изложения полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов, благодарностей, списка сокращений и условных обозначений и списка литературы. Список литературы содержит 302 наименования, в том числе – 290 зарубежных. Полный объем диссертации составляет 146 страниц машинописного текста, включая 23 рисунка и 12 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** описана актуальность исследуемой темы, сформулированы цели и задачи исследования, дана общая характеристика работы.

Глава 1 посвящена обзору литературы и постановке задач данного исследования. Приведены основные сведения о теоретических основах метода ИКФС и специфике его применения в микробиологических исследованиях. Также приведена общая информация об объектах исследования: (1) ПГБ, синтезируемом бактериями при неблагоприятных условиях в качестве запасного источника углерода и энергии, повышающем их выживаемость и устойчивость к различным стрессам и являющемся экологически безопасным биоразлагаемым пластиком; (2) бактериях рода *Azospirillum*, их практической значимости и существованию в естественных условиях.

Глава 2 посвящена описанию материалов, объектов и методов исследования. В работе использованы бактерии, полученные из Коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (WDCM 1021, www.collection.ibppm.ru): *A. baldaniorum* Sp245 (ранее известен как *A. brasilense* Sp245), *A. brasilense* Sp7 и *A. brasilense* Cd. Мутант *A. baldaniorum* Sp245.1610 и его производные – *A. baldaniorum* Sp245.1610 (pRK415), *A. baldaniorum* Sp245.1610 (pRK415-p1160043), *A. baldaniorum* Sp245.1610 (pRK415-p1160044) и *A. baldaniorum* Sp245.1610 (pRK415-p1160043-44) – получены и предоставлены сотрудниками лаборатории генетики микроорганизмов ИБФРМ РАН.

Культуры для всех экспериментов выращивали на синтетической малатной среде (СМС), предложенной Доберейнер и Дей [13]. Прекультуры для всех экспериментов выращивали при 32°C аэробно в колбах Эрленмейера объемом 250 мл, содержащих по 100 мл среды, в течение 18 ч. Культуры биопленок выращивали на среде СМС в оптимальных трофических условиях (0,5 г/л NH₄Cl), при 28–31°C, без перемешивания, в течение 5–6 сут. Для создания трофического стресса бактерии штаммов *A. baldaniorum* Sp245, *A. brasilense* Sp7 и Cd культивировали на среде СМС с различными концентрациями связанного азота (NH₄Cl): 0,1; 0,21 и 0,33 г/л – трофический стресс разной степени интенсивности, 0,5 г/л – стандартные условия (оптимальные трофические условия, контроль).

Для выделения ПГБ бактерии штамма *A. baldaniorum* Sp245 выращивали на среде СМС в отсутствие источника связанного азота (NH₄Cl). Культуру собирали центрифугированием, трижды отмывали физиологическим раствором (ФР) и высушивали до постоянной массы; сухую биомассу растирали, смешивали с хлороформом и экстрагировали на водяной бане при 45–50°C. Суспензию фильтровали, полученный фильтрат сушили. Очистку ПГБ от липидов проводили осаждением с использованием метанола.

ИК-спектры образцов измеряли на ИК-фурье-спектрометре Nicolet (модель Magna-IR 560 E.S.P., США) в режиме диффузного отражения (ДО) и Nicolet 6700 (Thermo Electron Corp., США) в режиме пропускания с разрешением 4 см⁻¹. Стандартная обработка спектров осуществлялась с использованием программного обеспечения OMNIC (версия 8.2.0.387).

Для измерений в режиме ДО образцы бактериальной биомассы готовили в 2-х вариантах: (1) в виде сухих тонкоизмельченных порошков; (2) в виде их смеси с KBr.

Для измерений в режиме пропускания образцы биомассы готовили в нескольких вариантах: (1) планктонную культуру собирали центрифугированием, трижды промывали ФР, высушивали, затем ресуспендировали в воде Milli-Q с/без предварительного измельчения; (2) биопленки, выращенные на обычных стеклах отмывали ФР один раз, высушивали, затем счищали скальпелем и ресуспендировали в воде Milli-Q; (3) биопленки, выращенные на стеклах из ZnSe отмывали ФР один раз, высушивали и сразу измеряли ИК-спектры. В первых двух вариантах полученную суспензию наносили на подложку из ZnSe, сушили и затем измеряли ИК-спектры.

Образцы ПГБ готовили двумя способами: (1) образец измельчали и прессовали в виде таблеток KBr; (2) для формирования пленки ПГБ растворяли в CHCl_3 и наносили на часовое стекло (либо раствор наносили на подложку из ZnSe) и высушивали.

Пленки ПГБ с одинаковой площадью, но различной толщиной, получали следующим образом: в одинаковые объемы хлороформа добавляли разные количества ПГБ (получали 0,5% и 2% растворы ПГБ) и затем высушивали полученные растворы в стаканах с плоским дном одинакового диаметра.

Для анализа относительного количественного содержания ПГБ в бактериальной биомассе рассчитывалась величина β , представляющая собой отношение площади полосы-маркера исследуемого вещества к площади полосы амид II на ИК-спектрах. Для стандартизации измерений на базе программы TQ Analyst EZ Edition был разработан алгоритм, позволяющий автоматически рассчитывать соотношение площади полосы-маркера к площади полосы амид II.

Расчет величины β для ПГБ осуществлялся по следующей формуле:

$$\beta = S_{\nu(\text{C}=\text{O})} / S_{\text{амид II}},$$

где $S_{\nu(\text{C}=\text{O})}$ – площадь полосы валентных колебаний карбонильной группы (C=O) в ПГБ (1770–1710 cm^{-1}), маркер содержания ПГБ; $S_{\text{амид II}}$ – площадь полосы амид II (1590–1480 cm^{-1}).

Для определения положения максимумов перекрывающихся полос ИК-спектры обрабатывались с помощью программного обеспечения OMNIC с получением второй производной.

Все эксперименты проводились в 3-х повторностях. Для большинства образцов ИК-спектры измерялись также в 3-х повторностях.

В главе 3 представлены основные результаты исследований и их обсуждение.

Влияние полярной матрицы на биологические образцы

При исследовании биологических образцов методом ИКФС широко используются традиционные методы пробоподготовки, ранее разработанные для изучения простых химических веществ и не учитывающие сложность первых. Известно, что использование галогенидных матриц может повлиять на положение полос, соответствующих различным полярным функциональным группам [14]. Таким образом, интерпретация измеренных ИК-спектров может зависеть от используемой методики пробоподготовки биологических образцов, в некоторых случаях приводя к ошибочным выводам.

Для изучения влияния галогенидно-солевого матрикса (в смеси с KBr) на положение полос функциональных групп на ИК-спектрах были изучены образцы: а) ПГБ-содержащей биомассы бактерий штамма *A. baldaniorum* Sp245; б) ПГБ, выделенного из клеток бактерий того же штамма. Бактерии выращивались на среде без связанного азота, т.е. в условиях, инициирующих синтез ПГБ.

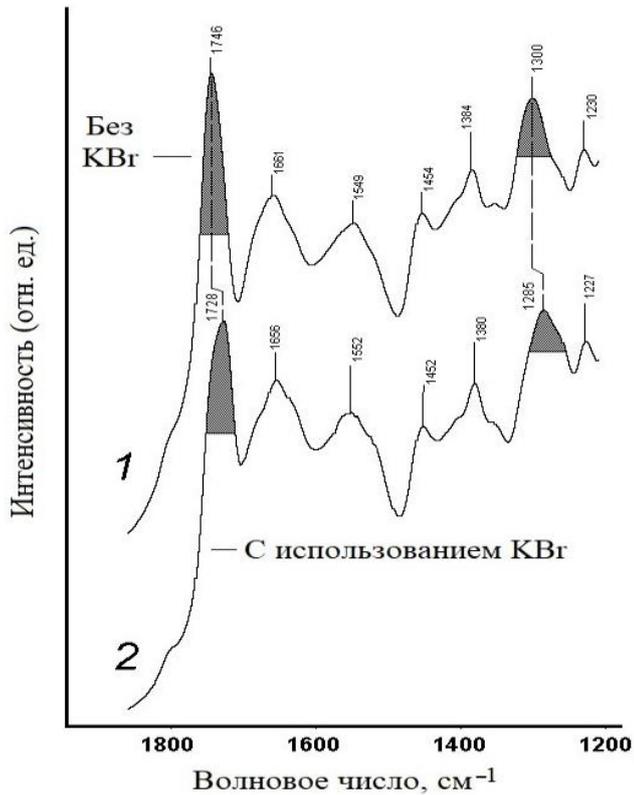


Рисунок 1 – ИК-спектры сухой биомассы бактерий штамма *A. baldaniorum* Sp245, содержащей ПГБ, измеренные в режиме ДО (1 – образец в виде порошка биомассы; 2 – образец в виде биомассы, перетертой с KBr).

Согласно полученным экспериментальным данным, для всех изученных образцов показаны значительные сдвиги максимумов полос сложноэфирной карбонильной группы $\nu(\text{C}=\text{O})$ и $\nu(\text{C}-\text{C}-\text{O}/\text{C}-\text{O}-\text{C})$ в ПГБ при измерении в режиме ДО для порошков с KBr или в режиме пропускания в таблетках, прессованных с KBr. Данные сдвиги объясняются процессами кристаллизации сложного полиэфир, что вызвано прессованием или просто измельчением образца с KBr.

Таблица 1 – Положения максимумов некоторых полос, соответствующих ПГБ, в исследуемых образцах

Образец	Колебания	Волновые числа (cm^{-1})	
		Без KBr	С KBr
Биомасса	$\nu(\text{C}=\text{O})$	1746	1728
	$\nu(\text{C}-\text{C}-\text{O}/\text{C}-\text{O}-\text{C})$	1300	1285
ПГБ	$\nu(\text{C}=\text{O})$	1745	1730
	$\nu(\text{C}-\text{C}-\text{O}/\text{C}-\text{O}-\text{C})$	1292	1279

Следовательно, для неинвазивного анализа таких чувствительных биомолекулярных образцов необходима методология пробоподготовки без использования галогенидной матрицы.

На рисунке 1 представлены ИК-спектры биомассы бактерий штамма *A. baldaniorum* Sp245, измеренные в режиме ДО. Образцы готовились в двух вариантах: 1) биомасса измельчалась непосредственно перед измерением; 2) биомасса измельчалась вместе с KBr (обычно используется при измерениях в режиме ДО в случае недостаточного количества образца).

Помимо полос основных биомолекул, на ИК-спектрах четко разрешимы полосы ПГБ. Как видно на рисунке 1, для образцов наблюдается различие в положении ряда полос ПГБ. На ИК-спектре образца, пробоподготовка которого включала только измельчение, полосы, чувствительные к степени упорядоченности сложного полиэфир [15], находятся в более высокочастотной области – при 1746 и 1300 cm^{-1} (таблица 1). В случае же ИК-спектра образца, пробоподготовка которого включала измельчение с KBr, данные полосы смещались в более низкочастотную область – 1728 и 1285 cm^{-1} (т.е. смещение на 18 и 15 cm^{-1}), соответственно. Аналогичные сдвиги данных полос ПГБ наблюдались и в спектре образца выделенного полимера в виде таблетки с KBr, измеренного в режиме пропускания, по сравнению с пленкой выделенного ПГБ (таблица 1).

Пробоподготовка для анализа бактериальных образцов методом просвечивающей ИК-фурье-спектроскопии

На примере штамма *A. baldaniorum* Sp245 была разработана методика пробоподготовки бактериальных образцов для их анализа методом ИКФС.

Для разработки пробоподготовки планктонная культура бактерий штамма *A. baldaniorum* Sp245 выращивалась на жидкой среде Доберейнер при оптимальных условиях. Биопленки выращивали на границах раздела фаз твердая поверхность/жидкость и жидкость/воздух (на среде СМС). Биопленки на твердой поверхности выращивали в 2-х вариантах: на подложке из обычного стекла (на основе SiO₂) и на стекле из ZnSe – соединения, прозрачного в среднем ИК-диапазоне.

Первым этапом при пробоподготовке образцов биопленок, выращенных как на обычных стеклах, так и на стеклах из ZnSe, была отмывка от среды выращивания, поскольку среда может вносить значительный вклад в ИК-спектры бактериальной культуры, что видно из ИК-спектра среды СМС (рисунок 2Б) – некоторые полосы находятся в той же области, что и полосы биологических образцов (рисунок 2А). Многоразовая отмывка (2–3 раза) приводила к значительным потерям образца, поскольку при выращивании на стеклах биопленки нарастали в малом количестве. Таким образом, для сохранения достаточного количества образца биопленок, выращенных на стеклах, оптимальной стала однократная отмывка биопленки.

Отмытые биопленки, выращенные на стеклах из ZnSe, высушивали и затем изучали методом ИКФС. Биопленки, выращенные на обычных стеклах, высушивали и счищали с поверхности стекла скальпелем. Затем проводили измельчение образца, ресуспендирование в небольшом количестве воды (Milli-Q) и нанесение на стекло из ZnSe с последующим высушиванием для измерения их ИК-фурье-спектров.

На рисунке 2 видно, что ИК-спектр биопленки, отмытой один раз, схож с ИК-спектром контроля (чистая биомасса); однако на нем заметен вклад компонентов среды в области основных полос. Следовательно, проводить достаточно точный количественный анализ таких спектров не представляется возможным.

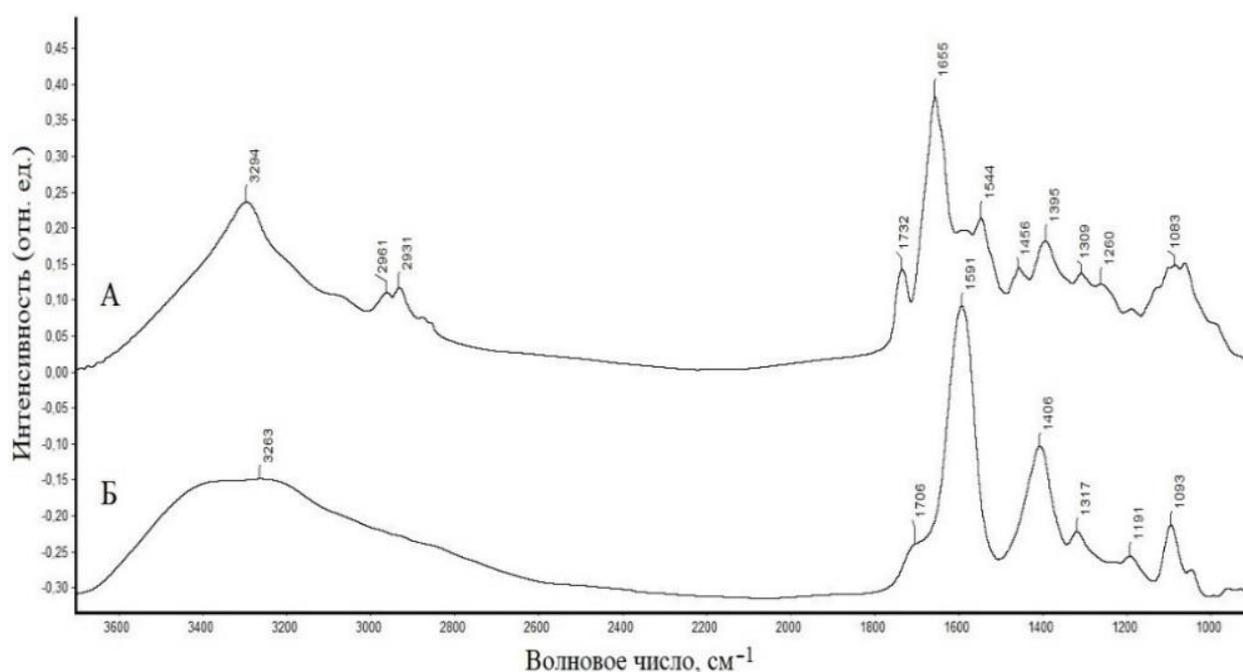


Рисунок 2 – ИК-спектры биопленок *A. baldaniorum* Sp245 (А) и среды СМС (Б)

Следует также отметить, что при выращивании непосредственно на стеклах из ZnSe биопленки неравномерно распределялись по поверхности стекла, что приводило к ухудшению качества измеряемых ИК-спектров и, соответственно, затрудняло их достоверный анализ.

В случае планктонной культуры нарастал достаточно большой объем биомассы и не образовывались какие-либо внеклеточные структуры, т.е. многократная отмывка не приводила к значимым потерям каких-либо компонентов. Таким образом, пробоподготовка в случае планктонной культуры включала в себя: (1) отбор 10–15 мл выросшей жидкой планктонной культуры; (2) ее осаждение центрифугированием, (3) 3-кратную отмывку ФР, (4) ресуспендирование 100–200 мкг в 100–200 мкл воды Milli-Q, (5) нанесение 70 мкл суспензии на стекло из ZnSe и ее высушивание при 45–50 °С. Пробоподготовка использовалась также и для образцов биопленок, выращенных на границе раздела фаз жидкость/воздух, поскольку в этом случае биомасса нарастала в достаточном объеме.

Данная методика также была применена при изучении других микробиологических образцов, таких как наночастицы селена, выделенные из клеток бактерий азоспирилл. Была использована пробоподготовка, предложенная для биопленок, выращенных на стеклах из ZnSe. В данном случае многократная отмывка (2–3 раза) аналогичным образом приводила не только к значительным потерям образца, но и к заметным изменениям в его структуре, что отображалось в изменении положений максимумов и интенсивностей полос на ИК-спектрах.

При малом количестве образца, или если биомасса образовывала флоккулы, пробоподготовку проводили без предварительного измельчения. Исключение этого этапа позволяет сохранять измеряемые образцы для их дальнейшего изучения. ИК-спектры образцов, пробоподготовку которых проводили без предварительного измельчения, не характеризовались какими-либо значительными отличиями от ИК-спектров тех же образцов, пробоподготовка которых включала предварительное измельчение, за исключением некоторых изменений в степени упорядоченности внутриклеточного ПГБ (сдвиг максимума полосы валентных колебаний групп C=O).

Таким образом, разработана методика пробоподготовки образцов биопленок и планктонной культуры для измерения спектров ИКФС в режиме пропускания, включающая следующие этапы: выращивание бактериальной культуры; отмывка (единичная – для биопленок, культивируемых на стеклах, трехкратная – для планктонной культуры); высушивание и измельчение в агатовой ступке (при необходимости); ресуспендирование в минимальном объеме воды MilliQ (100–200 мкл); нанесение в виде суспензии с водой Milli-Q (70 мкл) на диски из ZnSe и высушивание при 45 °С в течение 2–4 ч.

Влияние присутствия молекул связанной воды в поли-3-гидроксibuтирате на степень упорядоченности полимера

Были изучены пленки ПГБ с различной толщиной методом ИКФС в режиме пропускания. В качестве продуцента ПГБ использовались бактерии штамма *A. baldaniorum* Sp245.

Как видно на рисунке 3Б, ИК-спектр тонкой пленки ПГБ характеризовался упорядоченной структурой (максимум карбонильной группы $\nu(\text{C}=\text{O})$ при 1726 см^{-1}). На ИК-спектре образца более толстой пленки наблюдались два максимума полосы карбонильной группы при 1745 см^{-1} и 1724 см^{-1} , что отвечает соответственно аморфной и упорядоченной структуре (рисунок 3А).

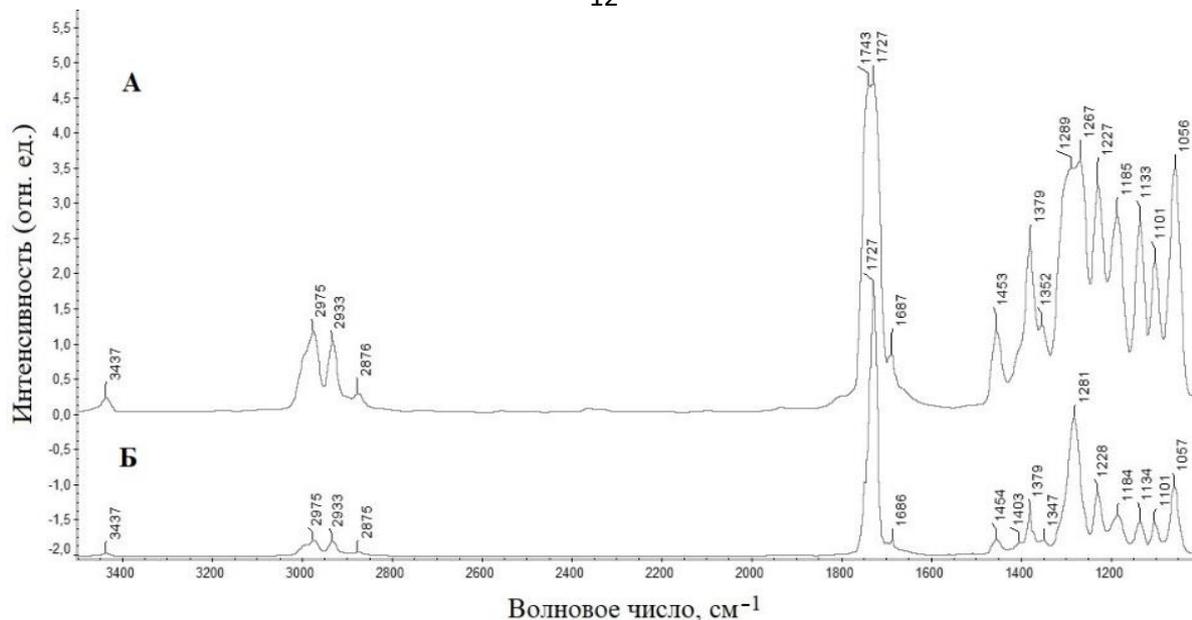


Рисунок 3 – ИК-спектр более толстой пленки ПГБ (А) и более тонкой пленки ПГБ (Б), выделенного из клеток штамма *A. baldaniorum* Sp245

Известно, что максимум полосы $\nu(\text{C}=\text{O})$, чувствительной к степени упорядоченности ПГБ, может находиться в пределах от 1750 до 1720 см^{-1} (т.е. в достаточно узком диапазоне шириной всего $\sim 30 \text{ см}^{-1}$) [15].

Чем ближе к 1720 см^{-1} находится максимум, тем более упорядоченную структуру имеет ПГБ. И наоборот, чем ближе максимум к 1750 см^{-1} , тем более аморфной структурой обладает данный полимер (последнее объясняется нарушением слабых водородных связей между цепями ПГБ; см. ниже; рис. 4). Важно отметить, что разрешающая способность ИК-фурье-спектрометра в наших экспериментах составляла 4 см^{-1} , т.е. наблюдаемые в данном исследовании смещения максимумов полос более чем на 10 см^{-1} существенно превышают погрешность спектрометра. Следовательно, наблюдаемое смещение максимума $\nu(\text{C}=\text{O})$ совместно со смещением другой полосы – $\nu(\text{C}-\text{C}-\text{O}/\text{C}-\text{O}-\text{C})$ при 1281 см^{-1} (рис. 3), также чувствительной к степени упорядоченности ПГБ, однозначно свидетельствует об изменении соотношения упорядоченной и аморфной структур в ПГБ. В данном случае единственным параметром, изменяемым при подготовке образцов ПГБ, была их толщина. Было зафиксировано, что с увеличением толщины пленки увеличивалось и относительное содержание аморфной составляющей.

На ИК-спектрах обоих образцов наблюдались слабые максимумы, соответствующие связанной воде (максимумы $\nu(\text{O}-\text{H})$ при 3437 см^{-1} и $\delta(\text{H}-\text{O}-\text{H})$ при 1687 см^{-1}). Отметим, что соотношение площадей полос, соответствующих воде и ПГБ, на ИК-спектрах образцов приблизительно сохранялось. Максимумы, соответствующие связанной воде, не исчезали из ИК-спектров образцов даже после их длительного высушивания при высокой температуре (~ 24 ч, $100 \text{ }^\circ\text{C}$).

Упорядоченное состояние полимера (кристалличность) – это правильная укладка как цепей макромолекул относительно друг друга, так и их боковых заместителей. Связи между ними формируют дальний порядок – упорядоченную структуру полимера, – и разрушение этих связей (рисунок 4Б), например, при плавлении [16], приводит к разупорядочению структуры полимера и увеличению относительного содержания его аморфной составляющей.

Параллельные спиральные структуры в ПГБ связаны между собой слабыми водородными связями $\text{C}-\text{H}\cdots\text{O}$ (рисунок 4А), образующимися между атомом Н в одной из трех связей $\text{C}-\text{H}$ в группе CH_3 и атомом О в карбонильной группе [17].

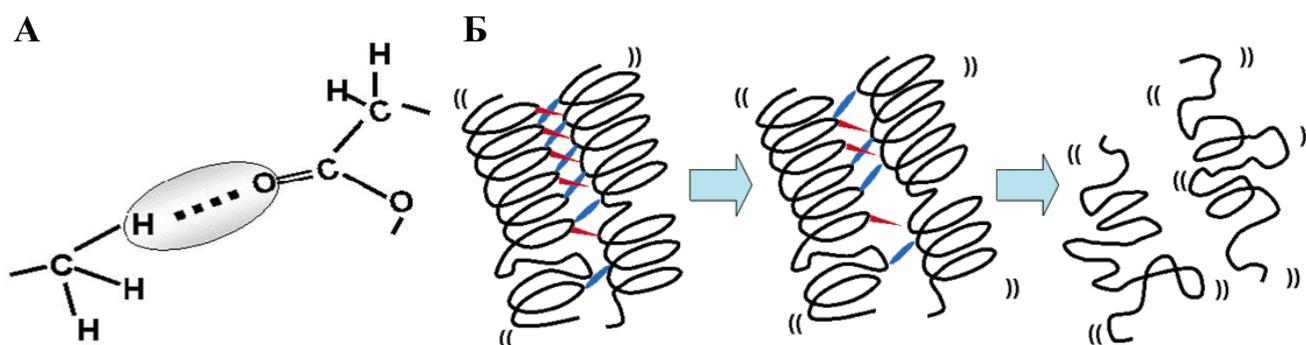


Рисунок 4 – Слабая Н-связь (С–Н···О) между спиралью ПГБ (А) и модель структуры ПГБ (Б) с разрушением слабых Н-связей при плавлении [16, 17]

Таким образом, увеличение содержания аморфной фазы в более толстой пленке ПГБ можно объяснить нарушением слабых водородных связей между цепями ПГБ в объеме пленки (но не на ее поверхности). Нарушение этих связей происходит в силу присутствия в объеме образца молекул воды (максимумы при 3437 и 1687 см^{-1} , рисунок 3). Последние встраиваются между соседними цепями полимера, образуя с ними более прочные мостики Н-связей типа $>\text{C}=\text{O}\cdots\text{H}-\text{O}-\text{H}\cdots\text{O}=\text{C}<$, приводя к смещению цепей ПГБ относительно друг друга и, следовательно, нарушению целостности его структуры. Для более толстых пленок этот эффект более заметен в силу того, что при увеличении количества соседних цепей, даже при сохранении соотношения количества молекул связанной воды к молекулам сложного полиэфира, происходит аддитивное увеличение нарушений положения цепей относительно друг друга, т.е. нарушается дальний порядок в полимере, что приводит к увеличению содержания менее упорядоченной структуры.

Таким образом, экспериментально установлено, что степень упорядоченности ПГБ зависит от толщины пленки. Присутствие аморфной фазы в пленках с большей толщиной объясняется частичным разрушением дальнего порядка в полимере вследствие смещения его цепей относительно друг друга. Данное смещение происходит из-за нарушения слабых «структурирующих» водородных связей типа $\text{CH}_3\cdots\text{O}=\text{C}<$ между спиралью полимера в результате присутствия молекул воды, фиксированных значительно более прочными водородными связями со сложноэфирными фрагментами биополимера.

Алгоритм расчета содержания компонента на основании соотношения площадей полос

На ИК-спектрах ПГБ дает ряд характерных полос, включая полосу, соответствующую валентным колебаниям карбонильной группы $\nu(\text{C}=\text{O})$ сложноэфирного фрагмента макромолекулы ПГБ, находящуюся в области $\sim 1750\text{--}1720$ см^{-1} . Данная полоса на ИК-спектрах бактериальных клеток не перекрывается другими полосами, позволяя легко идентифицировать и проводить определение ПГБ *in situ*.

Для анализа уровня накопления внутриклеточного ПГБ был модифицирован метод, предложенный в статье [1], основанный на анализе соотношения интенсивностей полосы валентных колебаний $\nu(\text{C}=\text{O})$ в области $\sim 1750\text{--}1720$ см^{-1} , являющейся маркером ПГБ, и полосы амид II около 1550 см^{-1} , соответствующей белковому компоненту (данная полоса используется в ИК-спектроскопии при анализе микробиологических объектов как внутренний стандарт). Данный метод не учитывает возможности присутствия в клетках ПГБ различной степени упорядоченности, которая отражается на ИК-спектрах в изменении ширины полосы $\text{C}=\text{O}$ и

перераспределении максимумов (более низкочастотные значения соответствуют ПГБ в упорядоченном состоянии, высокочастотные – в аморфном) [15]. Ввиду этого узкая, но интенсивная полоса C=O не всегда соответствует большому количеству внутриклеточного ПГБ, свидетельствуя лишь о значительном преобладании упорядоченной или аморфной структур в биополимере. Для более достоверного анализа количества синтезированного ПГБ нами предложено рассчитывать соотношение площадей полос (а не их интенсивностей), обозначенное как β . Таким образом, расчет относительного количества синтезированного ПГБ (величины β) проводили, используя формулу:

$$\beta = S_{\nu(C=O)} / S_{\text{амид II}},$$

где $S_{\nu(C=O)}$ – площадь полосы валентных колебаний карбонильной группы (C=O) в ПГБ (~ 1730) см^{-1} как маркера содержания ПГБ;

$S_{\text{амид II}}$ – площадь полосы амид II (соответствующей клеточным белкам; ~ 1550 см^{-1}).

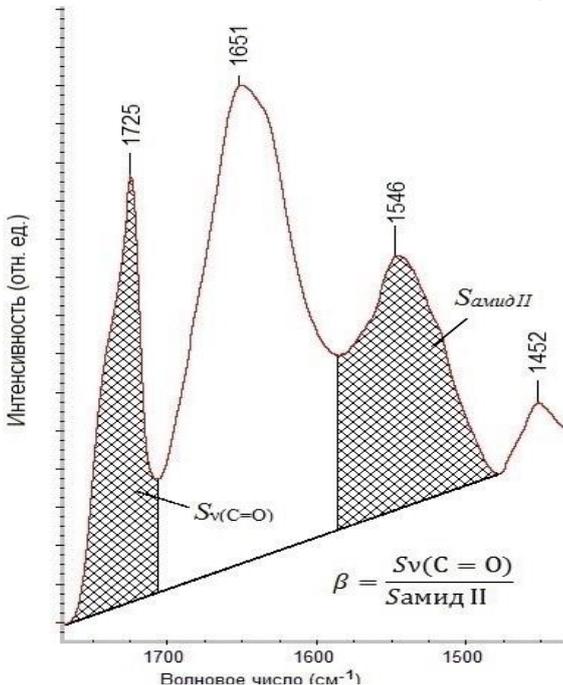


Рисунок 5 – Схема определения площадей полос для расчета величины β для ПГБ

Схема измерения соответствующих площадей представлена на рисунке 5.

Данный подход можно использовать не только при анализе внутриклеточного ПГБ. При возможности выделить на ИК-спектре полосу-маркер анализируемого макрокомпонента (полисахарид и др.), не перекрывающуюся с полосами других макрокомпонентов, можно также проанализировать его содержание относительно другой полосы-маркера, постоянной для исследуемого вещества.

Синтез поли-3-гидроксибутирата бактериями штаммов *A. baldaniorum* Sp245, *A. brasilense* Sp7 и *A. brasilense* Cd при трофическом стрессе различной степени интенсивности

С применением разработанных нами подходов были изучены особенности накопления ПГБ штаммами *A. brasilense* Sp7, *A. brasilense* Cd и *A. baldaniorum* Sp245 в условиях трофического стресса различной степени интенсивности. В исследовании использовали следующие концентрации связанного азота (NH_4Cl , г/л): 0,1, 0,21 и 0,33 – трофический стресс разной степени интенсивности; 0,5 – стандартные условия (оптимальные трофические условия, контроль). Культуры бактерий выращивали в течение 8 сут, измерения проводили после 1, 2, 3, 6 и 8 сут роста. На рисунке 6 показаны ИК-спектры (информативная область 1800–900 см^{-1}) образцов *A. brasilense* Sp7, культивируемых от 1 до 8 сут в присутствии 0,21 г/л NH_4Cl .

Значения β были рассчитаны по ИК-спектрам и представлены в таблице 2.

Как можно видеть из данных (рисунок 6 и таблица 2), в большинстве случаев, в условиях недостатка связанного азота (0,1–0,33 г/л NH_4Cl), содержание ПГБ увеличивается на 1 и 2 сут культивирования (для штамма *A. brasilense* Cd к 3 сут).

Почти во всех вариантах для всех 3-х штаммов (за исключением штамма *A. brasilense* Cd при 0,1 г/л NH_4Cl), выращенных как при недостатке связанного азота, так и в оптимальных трофических условиях, наблюдалось значительное снижение интенсивности полосы $\nu(C=O)$, свидетельствующей о присутствии ПГБ, вплоть до её исчезновения после 6 и 8 сут роста.

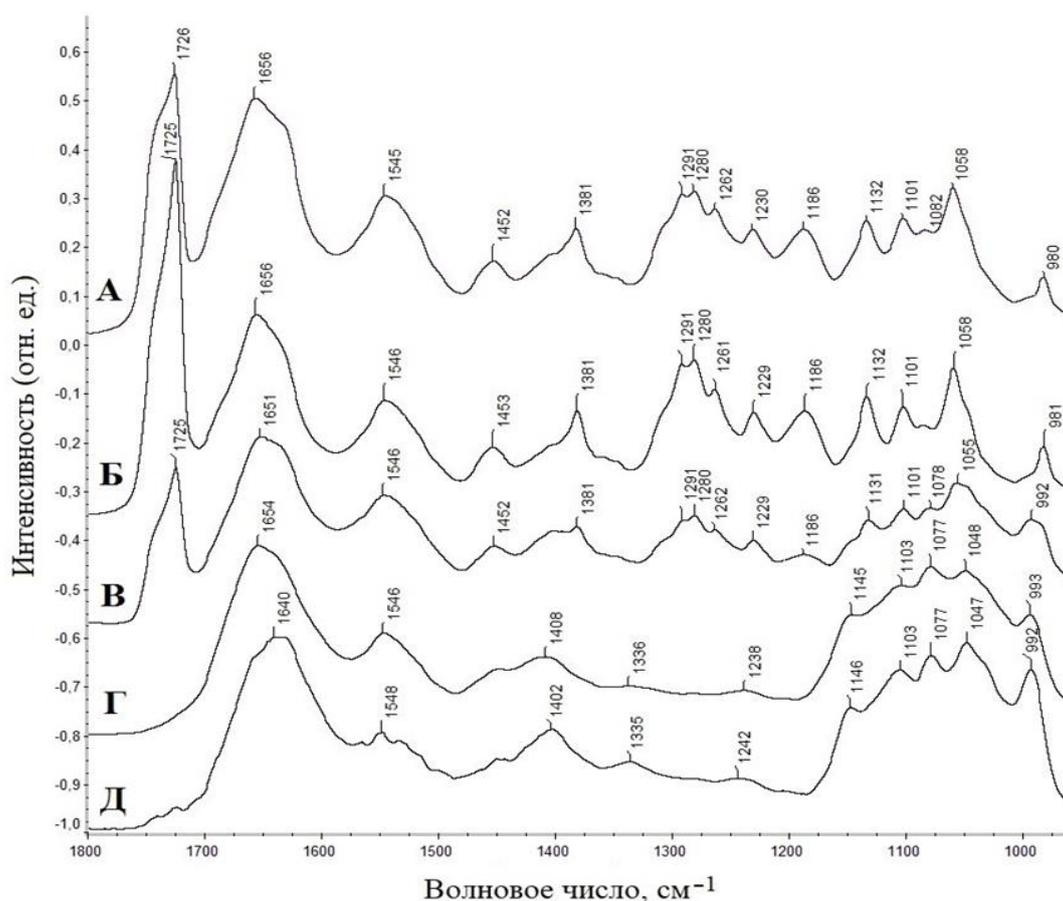


Рисунок 6 – ИК-спектры сухой биомассы штамма *A. brasilense* Sp7 при культивировании в течение до 8 сут в присутствии 0,21 г/л NH_4Cl в среде (А – 1 сут; Б – 2 сут; В – 3 сут; Г – 6 сут; Д – 8 сут)

Таблица 2 – Относительное содержание ПГБ в биомассе (величины β) для штаммов *A. baldaniorum* Sp245, *A. brasilense* Sp7 и *A. brasilense* Cd

Штамм	Условия роста (г/л NH_4Cl)	Сроки культивирования, сут				
		1	2	3	6	8
<i>A. baldaniorum</i> Sp245	0,1	0,15	0,39	0,42	–	–
	0,21	0,18	0,37	0,27	–	–
	0,33	0,22	0,29	0,21	0,13	–
	0,5	0,19	0,14	0,11	–	–
<i>A. brasilense</i> Sp7	0,1	2,13	2,20	0,94	0,11	–
	0,21	1,27	1,87	0,74	0,10	0,10
	0,33	0,92	0,53	0,21	–	–
	0,5	0,27	0,13	–	–	–
<i>A. brasilense</i> Cd	0,1	0,25	1,33	1,53	0,54	0,48
	0,21	0,25	0,79	1,15	0,10	0,11
	0,33	0,26	0,65	0,72	0,12	0,12
	0,5	0,20	0,28	0,12	–	–

Обозначения: «–» – значение $\beta < 0,1$. Дополнительными экспериментами показано, что при отсутствии ПГБ в биомассе $\beta = 0,05$ (поскольку очень слабое поглощение сложноэфирной группы, $\nu(\text{C}=\text{O})$, соответствует липополисахаридам и фосфолипидам клетки); при смешивании 40 мас.% коммерческого ПГБ с такой биомассой измеряемое значение $\beta = 1,35$ (пропорционально мас.% ПГБ).

Наибольшие количества ПГБ накапливались штаммами *A. brasilense* Sp7 и Cd при добавлении в среду 0,1 и 0,21 г/л NH_4Cl после 2 и 3 сут; наибольшее значение β составило 1,53 для штамма Cd (3 сут; 0,1 г/л NH_4Cl) и 2,1–2,2 для штамма Sp7 (1 и 2 сут; 0,1 г/л NH_4Cl). Для *A. brasilense* Sp7 значения β в целом были немного выше, чем для *A. brasilense* Cd. Накопление больших количеств ПГБ при трофическом стрессе штаммами *A. brasilense* Sp7 и *A. brasilense* Cd по сравнению с *A. baldaniorum* Sp245 может объясняться тем фактом, что Cd является реизолятом *A. brasilense* Sp7 [18].

Схожая динамика накопления ПГБ наблюдалась для *A. baldaniorum* Sp245. Однако для последнего значения β были в несколько раз ниже, что свидетельствует о гораздо менее интенсивном накоплении ПГБ по сравнению со штаммами *A. brasilense* Sp7 и Cd при идентичных стрессовых условиях.

Значительные различия в метаболическом отклике между *A. baldaniorum* Sp245 по сравнению с *A. brasilense* Sp7 и *A. brasilense* Cd объясняются тем, что, как недавно было показано, исследуемый штамм *A. baldaniorum* Sp245 (ранее известный как *A. brasilense* Sp245, выделен в отдельный вид [19]) занимает отличную экологическую нишу и, соответственно, обладает иными защитными механизмами [20].

На ИК-спектрах всех 3-х штаммов, росших при добавлении в среду 0,33 и 0,5 г/л NH_4Cl , помимо сохранения общей динамики снижения содержания внутриклеточного ПГБ к поздним срокам культивирования, отмечена также малая интенсивность полосы валентных колебаний $\text{C}=\text{O}$ на всех этапах роста. Полоса представляла собой слабо выраженное плечо, и рассчитанные величины β в среднем составляли 0,3; максимальное значение составляло 0,92 для *A. brasilense* Sp7 при 0,33 г/л NH_4Cl и на 1 сут роста (таблица 2).

Таким образом, увеличение содержания связанного азота (NH_4Cl) в среде, соответствующее снижению трофического стресса, приводило к заметному снижению накопления ПГБ при культивировании в аэробных условиях у *A. baldaniorum* и *A. brasilense*. Однако для штаммов *A. brasilense* Sp7 и Cd это снижение выражено сильнее, чем для штамма *A. baldaniorum* Sp245.

Методом ИКФС проведен мониторинг накопления ПГБ штаммами видов *A. baldaniorum* и *A. brasilense* в ходе культивирования при трофическом стрессе различной интенсивности без дополнительных стадий выделения и очистки сложного полиэфира. Были показаны различия в накоплении ПГБ в зависимости от исходных концентраций связанного азота в среде культивирования. Также были показаны различия для штаммов двух разных видов, занимающих разные экологические ниши и, следовательно, обладающих различиями в их адаптивных стратегиях.

Анализ макрокомпонентного состава биопленки, образованной штаммом *A. baldaniorum* Sp245

Были изучены зрелые биопленки, образованные на границе раздела фаз жидкость–воздух бактериями штамма *A. baldaniorum* Sp245; клетки, отделенные от биопленки центрифугированием; выделенный матрикс биопленок (МБ); макрокомпоненты МБ.

На первом этапе работы с помощью ИКФС был проведен сравнительный анализ зрелых биопленок (5 сут), его матрикса и отдельных клеток, полученных путем центрифугирования. Все три ИК-спектра имели характерную для бактериальных образцов форму; как можно видеть на рисунке 7, ИК-спектр биопленки слабо отличался от измеренных ИК-спектров образцов выделенных клеток и МБ, что указывает на аналогичное соотношение макрокомпонентов в их составе.

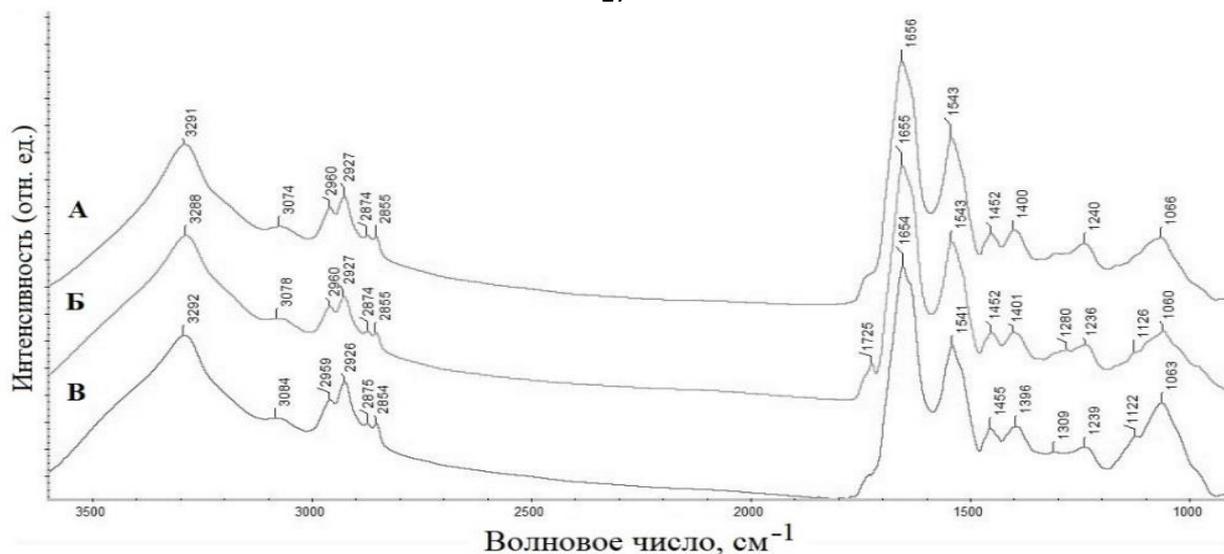


Рисунок 7 – ИК-спектры образцов биопленки, образованной штаммом *A. baldaniorum* Sp245 (А), выделенных из биопленки клеток (Б) и матрикса биопленки (В)

Отличия на измеренных ИК-спектрах наблюдались лишь в области полосы при ~ 1730 cm^{-1} , соответствующей валентным колебаниям функциональной группы $\text{C}=\text{O}$ (маркер ПГБ). На ИК-спектре отдельных клеток полоса $\nu(\text{C}=\text{O})$ обладала наибольшей интенсивностью, чем таковая на ИК-спектрах биопленки и матрикса. Большую интенсивность полосы $\nu(\text{C}=\text{O})$ (по сравнению с ИК-спектром биопленки) можно связать с удалением из образца матрикса, на ИК-спектре которого, как видно на рисунке 7В, полоса $\nu(\text{C}=\text{O})$ минимальна по интенсивности.

Делением МБ на колонке с носителем Sepharose CL-6В были получены фракции с различными молекулярными массами (МБ1 и МБ2). ИК-спектры этих образцов заметно отличались друг от друга (рисунок 8).

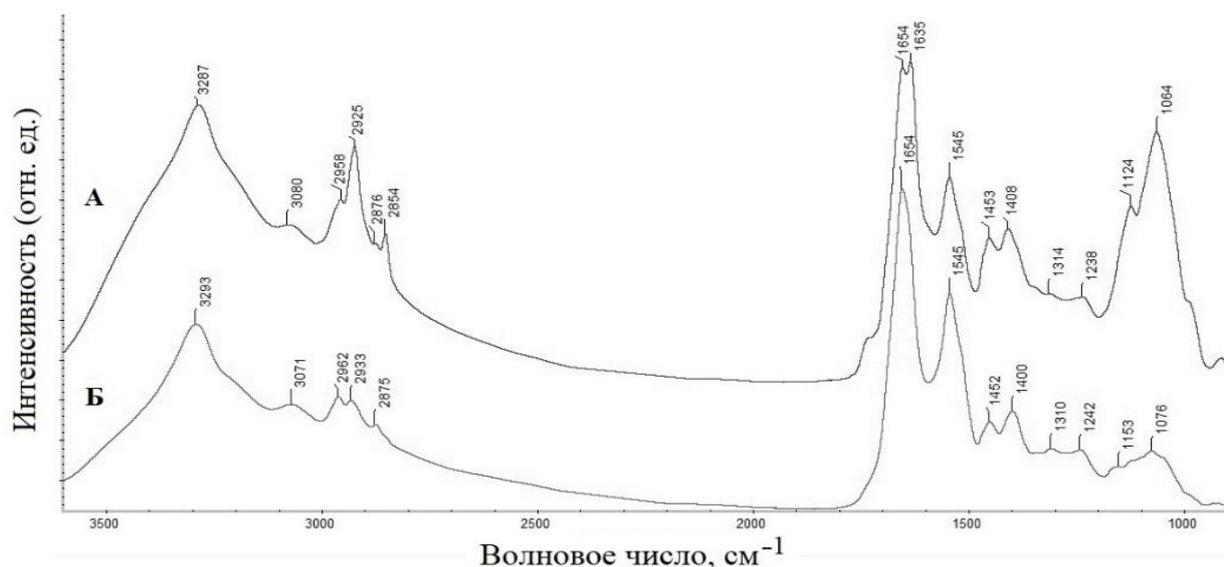


Рисунок 8 – ИК-спектры образцов МБ1 (А) и МБ2 (Б), полученных из препарата матрикса биопленки делением на хроматографической колонке

На ИК-спектре образца МБ1 в области амид I (белковая составляющая) имелось два максимума, соответствующих разным вторичным структурам – α -спирали при 1654 cm^{-1} и β -слоям при 1635 cm^{-1} .

Для МБ2 в области полосы амид I на ИК-спектре имелся лишь один максимум с частотой 1654 см^{-1} , что соответствует преимущественному содержанию вторичной структуры белкового компонента в виде α -спирали.

Помимо различий в соотношении конформаций белковой составляющей, ИК-спектр образца МБ1 характеризовался значительно более интенсивной полосой полисахаридной составляющей ($\sim 1200\text{--}1000\text{ см}^{-1}$) по сравнению с таковой на ИК-спектре образца МБ2, а также наличием полос, характерных для липидов (плечо $\nu(\text{C}=\text{O})$ ок. 1740 см^{-1} и заметно увеличенные по интенсивности полосы колебаний групп $-\text{CH}_2-$ и $-\text{CH}_3$ в областях $3000\text{--}2800$ (валентные) и 1453 см^{-1} (деформационные)).

Для получения углеводных составляющих матрикса биопленки был проведен мягкий кислотный гидролиз препарата 2% АсОН при $100\text{ }^\circ\text{C}$ (4 ч). На рисунке 9 приведен ИК-спектр образца углеводной составляющей матрикса биопленки (МБ3). На ИК-спектре имелись интенсивные полосы полисахаридной составляющей. Наряду с этими полосами на ИК-спектре также имелись четко разрешимые полосы белковой составляющей (амид I и амид II).

На ИК-спектрах любых бактериальных образцов полоса амид I не перекрывается никакими другими полосами био(макро)молекул и строго соответствует пептидной связи в белковой составляющей клеток [1].

Наличие как полосы амид I, так и полосы амид II, а также соотношение их интенсивностей на спектре образца МБ3 имеет картину, характерную именно для белковой составляющей (рисунок 9).

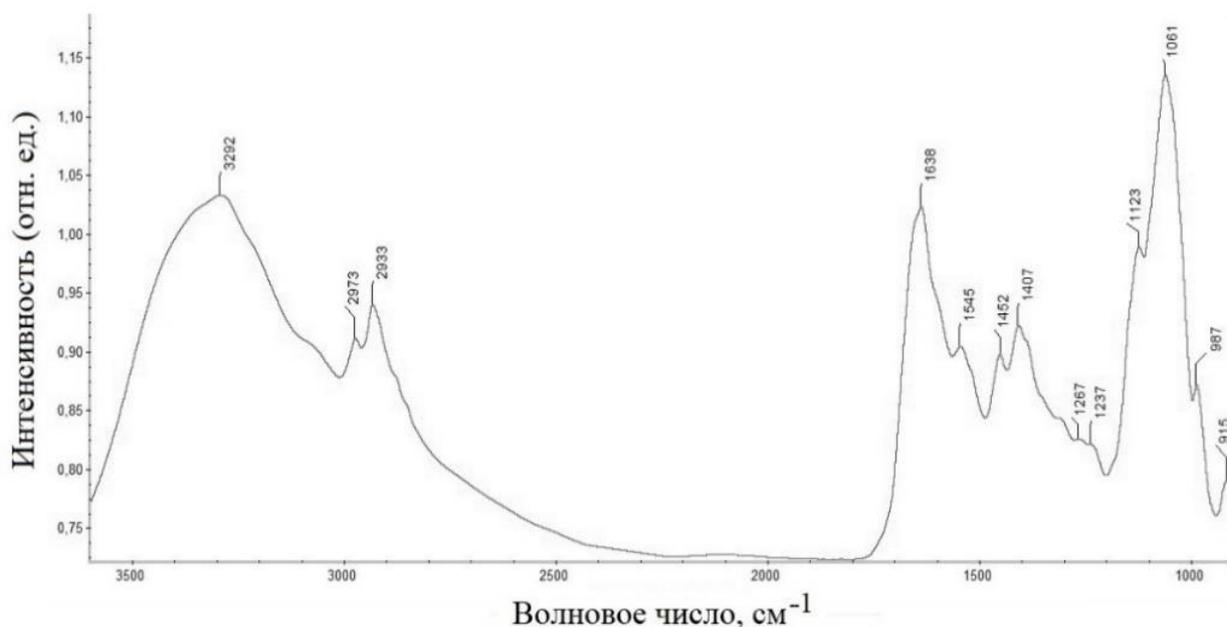


Рисунок 9 – ИК-спектр образца углеводной составляющей матрикса биопленки (МБ3)

Стоит отметить также, что в соответствии с литературными данными полосы основных макрокомпонентов бактериальных клеток, в том числе и белковой составляющей, вносят заметный вклад в ИК-спектр лишь в тех случаях, когда относительное содержание компонента в образце более 10% [1].

Полное расщепление пептидных связей необходимо проводить в жестких условиях (6 M HCl, в течение 72 ч и при температуре не ниже 105°C) [21]. Это, а также все вышесказанное позволяет предположить присутствие в образце МБ3 полипептидных остатков.

Сравнительное изучение биопленок, сформированных бактериями штамма *A. baldaniorum* Sp245 и его мутанта *A. baldaniorum* Sp245.1610

Следующим этапом стала сравнительная характеристика биопленок, образованных диким штаммом *A. baldaniorum* Sp245 и его мутантом Sp245.1610. Зрелые биопленки выращивались непосредственно на поверхности стекла из ZnSe в течение 6 сут.

На рисунке 10 показаны ИК-спектры образцов биопленок дикого штамма *A. baldaniorum* Sp245 и его мутанта *A. baldaniorum* Sp245.1610.

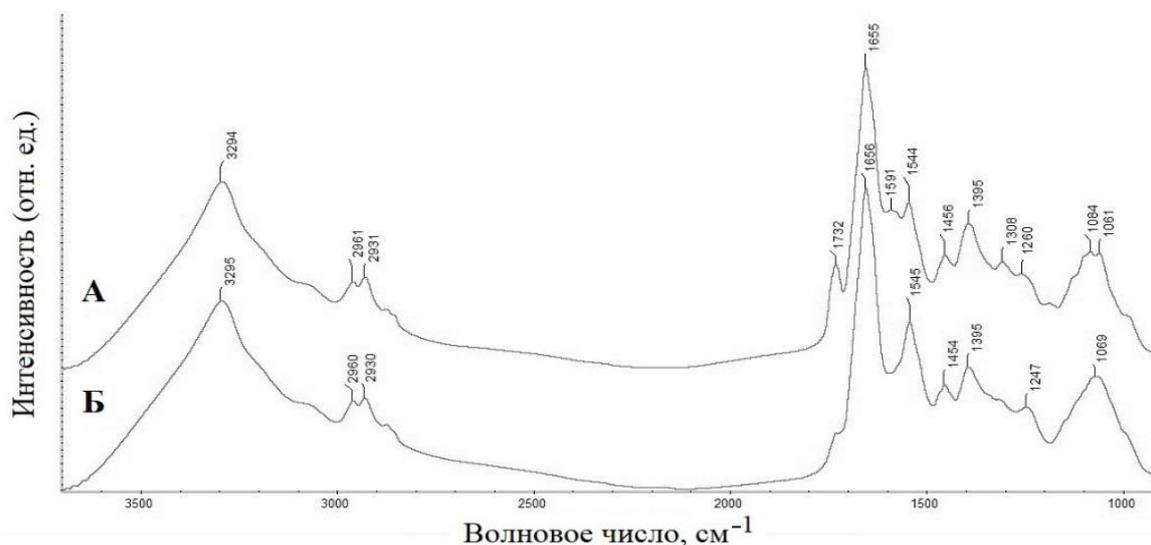


Рисунок 10 – ИК-спектры зрелой 6-суточной биопленки, образованной *A. baldaniorum* Sp245 (А) и его мутантным штаммом *A. baldaniorum* Sp245.1610 (Б)

На ИК-спектрах 6-сут зрелых биопленок, образованных штаммом *A. baldaniorum* Sp245 и его мутантом Sp245.1610, видны полосы, соответствующие типичным функциональным группам в бактериальных макрокомпонентах. Различия между ИК-спектрами биопленок невелики, но визуально различимы.

На спектре дикого штамма (рисунок 10А) проявляется хорошо разрешенная полоса при 1732 см^{-1} , типичная для С=О связи ПГБ.

В условиях трофического стресса (недостаток связанного азота) бактерии вида *A. baldaniorum* накапливают значительные количества ПГБ. В данном случае среда СМС содержала $0,5\text{ г/л NH}_4\text{Cl}$, что соответствует оптимальным питательным условиям для этих бактерий [13], но, тем не менее, ПГБ синтезировался в заметных количествах.

На ИК-спектре мутанта *A. baldaniorum* Sp245.1610 в этой области присутствовало лишь слабое плечо (рисунок 10Б), что свидетельствует о накоплении заметно меньшего количества ПГБ при идентичных условиях.

Для более четкого выявления различий на ИК-спектрах была проведена их дополнительная математическая обработка. Так, для ИК-спектров биопленок (рисунок 10) были получены вторые производные с применением программного обеспечения OMNIC (рисунок 11).

Минимум на второй производной ИК-спектра при 1732 см^{-1} (для С=О в ПГБ) значительно ниже для *A. baldaniorum* Sp245 (рисунок 11А), чем для штамма-мутанта (рисунок 11Б). Таким образом, анализ вторых производных подтвердил выявленные различия. Отметим, что на вторых производных ИК-спектров в области амид I, помимо основного минимума (1655 см^{-1} ; α -спирали), выявляется также минимум при 1633 см^{-1} (β -слои), что соответствует лишь визуальной различимой асимметрии полосы амид I в данной области на исходных ИК-спектрах (см. рисунок 10).

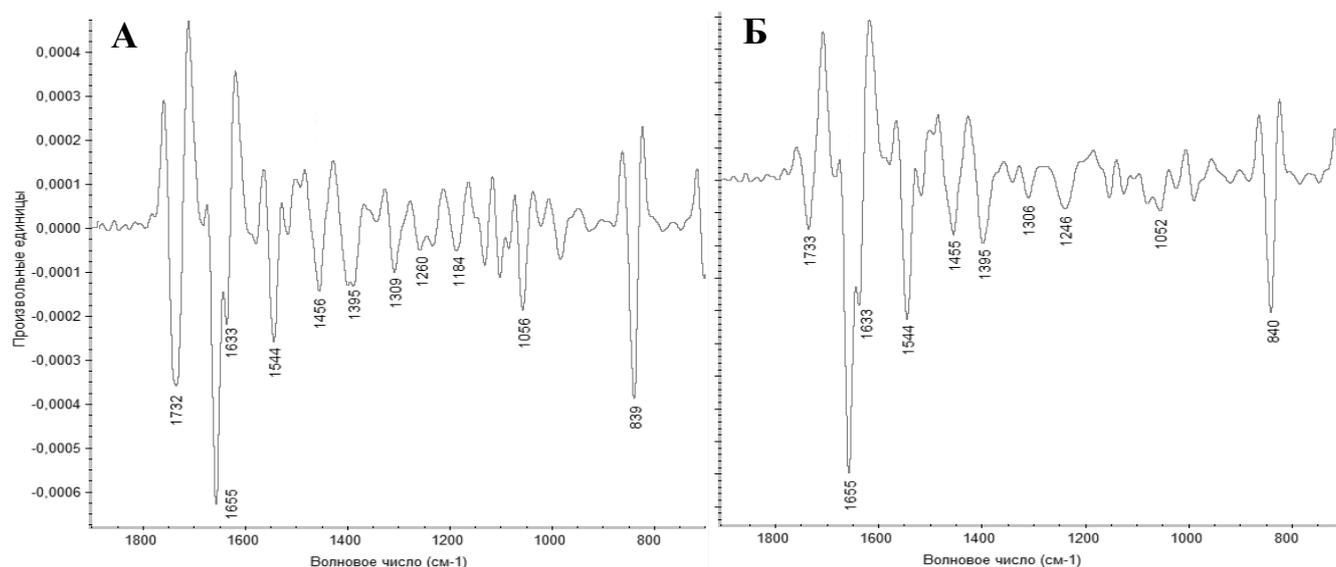


Рисунок 11 – Вторые производные ИК-спектров биопленок, образованных диким штаммом *A. baldaniorum* Sp245 (А) и его штаммом-мутантом *A. baldaniorum* Sp245.1610 (Б), выращенных на поверхности стекла из ZnSe

Известно, что штамм-мутант *A. baldaniorum* Sp245.1610 имеет вставку в гене липидного метаболизма *fabG1* [22]. Продукт гена *fabG1* не участвует в синтезе ПГБ, но, вероятно, опосредованно влияет на процессы накопления ПГБ клетками азоспирилл, поскольку продукты расщепления жирных кислот участвуют в цикле синтеза ПГБ.

Поскольку пути превращений и синтеза жирных кислот и ПГБ напрямую связаны друг с другом, мутация по предполагаемому гену липидного метаболизма, вероятно, оказывает влияние и на процессы синтеза ПГБ, нарушение которых также может приводить к изменениям в процессах формирования и стабильности зрелой биопленки.

Сравнительное исследование синтеза поли-3-гидроксибутирата у бактерий дикого штамма *A. baldaniorum* Sp245, мутанта *A. baldaniorum* Sp245.1610 и его комплементированных производных

Проведено сравнительное исследование синтеза ПГБ бактериями дикого штамма *A. baldaniorum* Sp245, его мутанта *A. baldaniorum* Sp245.1610 и производными последнего, культивируемыми в виде планктонных культур.

Рассчитанные величины β для исследуемых образцов представлены в таблице 3. Планктонная культура мутантного штамма *A. baldaniorum* Sp245.1610, культивируемая в жидкой среде СМС и в условиях трофического стресса, синтезирует меньше ПГБ, чем дикий штамм.

Однако после введения в клетки штамма-мутанта вектора pRK415 с клонированными генами *fabG1*, *fabH1* или *fabG1-fabH1* наблюдались изменения в интенсивности синтеза ПГБ. Так, при введении в клетки бактерий вектора с геном *fabG1* наблюдалось восстановление функции синтеза полимера. Аналогичным образом наблюдалось увеличение количества синтезированного ПГБ при введении в клетки соседнего с *fabG1* – гена *fabH1*; происходит увеличение дозы гена. При этом при введении в клетки одновременно двух генов *fabG1-fabH1*, ПГБ накапливался в заметно больших количествах, чем в случае родительского штамма и производных штамма-мутанта, т.е. наблюдался эффект аддитивности.

Таблица 3 – Относительное содержание ПГБ в биомассе (величины β) для бактерий штамма *A. baldaniorum* Sp245, его мутанта *A. baldaniorum* Sp245.1610 и комплементированных производных последнего

Штамм/производный	Величина β ¹
<i>A. baldaniorum</i> Sp245	0,22
<i>A. baldaniorum</i> Sp245.1610	0,14
<i>A. baldaniorum</i> Sp245.1610(pRK415- <i>fabG1</i>)	0,29
<i>A. baldaniorum</i> Sp245.1610(pRK415- <i>fabH1</i>)	0,26
<i>A. baldaniorum</i> Sp245.1610(pRK415- <i>fabG1-fabH1</i>)	0,34

¹ Расчетные значения относительной стандартной ошибки величин β в данном диапазоне не превышают $\pm 6\%$, что соответствует величинам абсолютной стандартной ошибки $\pm(0,01-0,02)$.

Полученные данные свидетельствуют о влиянии продуктов генов *fabG1* и *fabH1* на процесс накопления ПГБ в клетках азоспирилл.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны методологические основы применения ИКФС в режиме пропускания: (1) предложена оптимальная пробоподготовка бактериальной культуры, находящейся в различных физиологических состояниях (планктонная культура и биопленки); (2) на примере поли-3-гидроксibuтирата (ПГБ) разработан алгоритм расчета относительного содержания различных макрокомпонентов на основании соотношения площадей полос на ИК-спектрах. Показано, что использование полярной матрицы (KBr) для пробоподготовки сухой бактериальной биомассы индуцирует кристаллизацию неупорядоченной фракции внутриклеточного ПГБ.

2. Образцы ПГБ характеризуются разной степенью упорядоченности в зависимости от их толщины. Повышение доли аморфной фазы в пленках с большей толщиной объясняется нарушением дальнего порядка в объеме полимера вследствие смещения его цепей относительно друг друга. Данное смещение происходит из-за нарушения слабых «структурирующих» водородных связей $-CH_3 \cdots O=C<$ между спиралями полимера в результате присутствия молекул воды, связанных водородными связями со сложноэфирными фрагментами соседних цепей биополимера.

3. Из трех штаммов – *A. brasilense* Sp7, *A. brasilense* Cd и *A. baldaniorum* Sp245, культивируемых в течение 8 сут, – наибольшее количество ПГБ в условиях трофического стресса различной степени интенсивности накапливают бактерии штамма *A. brasilense* Sp7 при добавлении в среду 0,1 г/л NH_4Cl на ранней стационарной фазе роста (1–2 сут).

4. Методом ИКФС показано, что штамм-мутант *A. baldaniorum* Sp245.1610, имеющий вставку Omegaon Km в гене липидного метаболизма *fabG1*, обладает пониженной способностью к синтезу ПГБ по сравнению с родительским штаммом *A. baldaniorum* Sp245 как в планктонной культуре, так и в биопленке. Показано влияние продуктов генов *fabG1* и *fabH1*, предположительно кодирующих 3-оксоацил-[ацилпереносающий белок]-редуктазу и 3-оксоацил-[ацилпереносающий белок]-синтазу, соответственно, на процессы синтеза ПГБ.

СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lasch, P. Infrared spectroscopy in microbiology. / P. Lasch, D. Naumann // Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation. John Wiley & Sons, Chichester, UK, 2015. – P. 1–32.
2. Kadouri, D. Ecological and agricultural significance of bacterial polyhydroxyalkanoates / D. Kadouri, E. Jurkevitch, Y. Okon, S. Castro-Sowinski // Crit. Rev. Microbiol. – 2005. – Vol. 31. – No. 2. – P. 55–67.
3. Fibach-Paldi, S. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense* / S. Fibach-Paldi, S. Burdman, Y. Okon // FEMS Microbiol. Lett. – 2012. – Vol. 326. – No. 2. – P. 99–108.
4. Assmus, B. In situ localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy / B. Assmus, P. Hutzler, G. Kirchhof, R. Amann, J.R. Lawrence, A. Hartmann // Appl. Environ. Microbiol. – 1995. – Vol. 61. – No. 3. – P. 1013–1019.
5. Riddle, J.W. Bacterial identification by infrared spectrophotometry / J.W. Riddle, P.W. Kabler, B.A. Kenner, R.H. Bordner, S.W. Rockwood, H.J. Stevenson // J. Bacteriol. – 1956. – Vol. 72. – N. 5. – P. 593–603.
6. Naumann, D. The ultra rapid differentiation and identification of pathogenic bacteria using FT-IR techniques / D. Naumann // Fourier and Computerized Infrared Spectroscopy. – Proc. SPIE, 1985. – Vol. 553. – P. 268–269.
7. Helm, D. Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy / D. Helm, H. Labischinski, G. Schallehn, D. Naumann // Microbiology. – 1991. – Vol. 137. – No. 1. – P. 69–79.
8. De Meutter, J. FTIR imaging of protein microarrays for high throughput secondary structure determination / J. De Meutter, E. Goormaghtigh // Anal. Chem. – 2021. – Vol. 93. – No. 8. – P. 3733–3741.
9. Fang, X. Chemical and biological characterization of polysaccharides from the bark of *Avicennia marina* / X. Fang, X. Yin, G. Yuan, X. Chen // Eur. Food Res. Technol. – 2015. – Vol. 241. – No. 1. – P. 17–25.
10. Tatulian, S.A. Attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy: a method of choice for studying membrane proteins and lipids / S.A. Tatulian // Biochemistry. – 2003. – Vol. 42. – No. 41. – P. 11898–11907.
11. Żarnowiec, P. Fourier transform infrared spectroscopy as a tool in analysis of *Proteus mirabilis* endotoxins / P. Żarnowiec, G. Czerwonka, W. Kaca // Microbial Toxins. – Humana Press, New York, 2017. – P. 113–124.
12. Hu, C. Photocatalytic degradation of pathogenic bacteria with AgI/TiO₂ under visible light irradiation / C. Hu, J. Guo, J. Qu, X. Hu // Langmuir. – 2007. – Vol. 23. – No. 9. – P. 4982–4987.
13. Döbereiner, J. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. / J. Döbereiner, J.M. Day // Symposium on Nitrogen Fixation. Washington State University Press, Pullman, 1976. – P. 518–538.
14. Kamnev, A.A. Comparative spectroscopic characterization of different pectins and their sources / A.A. Kamnev, M. Colina, J. Rodriguez, N.M. Ptitchkina, V.V. Ignatov // Food Hydrocoll. – 1998. – Vol. 12. – No. 3. – P. 263–271.
15. Padermshoke, A. Melting behavior of poly(3-hydroxybutyrate) investigated by two-dimensional infrared correlation spectroscopy / A. Padermshoke, Y. Katsumoto, H. Sato, S. Ekgasit, I.

Noda, Y. Ozaki // Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc. – 2005. – Vol. 61. – No. 4. – P. 541–550.

16. Sato, H. Thermal behavior and molecular interaction of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) studied by wide-angle X-ray diffraction / H. Sato, M. Nakamura, A. Padermshoke, H. Yamaguchi, H. Terauchi, S. Ekgasit, I. Noda, Y. Ozaki // Macromolecules. – 2004. – Vol. 37. – No. 10. – P. 3763–3769.

17. Sato, H. Infrared and Raman spectroscopy and quantum chemistry calculation studies of C–H···O hydrogen bondings and thermal behavior of biodegradable polyhydroxyalkanoate / H. Sato, R. Murakami, I. Noda, Y. Ozaki // J. Mol. Struct. – 2005. – Vol. 744. – P. 35–46.

18. Eskew, D.L. Nitrogen fixation, denitrification, and pleomorphic growth in a highly pigmented *Spirillum lipoferum* / D.L. Eskew, D.D. Focht, I.P. Ting // Appl. Environ. Microbiol. – 1977. – Vol. 34. – No. 5. – P. 582–585.

19. dos Santos Ferreira, N. Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Sp245 as the type strain of *Azospirillum baldaniorum* sp. nov. / N. dos Santos Ferreira, F. Hayashi Sant'Anna, V. Massena Reis, A. Ambrosini, C. Gazolla Volpiano, M. Rothballer, S. Schwab, V.A. Baura, E. Balsanelli, F. de Oliveira Pedrosa, L.M. Pereira Passaglia, E.M. de Souza, A. Hartmann, F. Cassán, J.E. Zilli // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2020. – Vol. 70. – No. 12. – P. 6203–6212.

20. Bashan, Y. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003) / Y. Bashan, G. Holguin, L.E. De-Bashan // Can. J. Microbiol. – 2004. – Vol. 50. – No. 8. – P. 521–577.

21. Дейл З., Мацек К., Янак Я. Жидкостная колоночная хроматография. – 1978.

22. Kovtunov, E.A. Mutants of bacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 with Omegon insertion in *mmsB* or *fabG* genes of lipid metabolism are defective in motility and flagellation / E.A. Kovtunov, A.V. Shelud'ko, M.P. Chernyshova, L.P. Petrova, E.I. Katsy // Russ. J. Genet. – 2013. – Vol. 49. – No. 11. – P. 1107–1111.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК РФ для опубликования результатов диссертационных исследований:

1. Tugarova, A.V. Poly-3-hydroxybutyrate synthesis by different *Azospirillum brasilense* strains under varying nitrogen deficiency: A comparative *in-situ* FTIR spectroscopic analysis / A.V. Tugarova, **Yu.A. Dyatlova**, O.A. Kenzhegulov, A.A. Kamnev // Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc. – 2021. – Vol. 252. – P. 119458.

2. Kamnev, A.A. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic analyses of microbiological samples and biogenic selenium nanoparticles of microbial origin: sample preparation effects / A.A. Kamnev, **Yu.A. Dyatlova**, O.A. Kenzhegulov, A.A. Vladimirova, P.V. Mamchenkova, A.V. Tugarova // Molecules. – 2021. – Vol. 26. – N. 4. – P. 1146.

3. Tugarova, A.V. Bacteria as cell factories for producing selenium nanoparticles: their synthesis by the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* and characterization / A.A. Tugarova, P.V. Mamchenkova, **Yu.A. Dyatlova**, A.A. Kamnev // New Biotechnol. – 2018. – Vol. S44. – P. S18–S20.

4. Kamnev, A.A. Methodological effects in Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy: Implications for structural analyses of biomacromolecular samples / A.A. Kamnev, A.V. Tugarova, **Yu.A. Dyatlova**, P.A. Tarantilis, O.P. Grigoryeva, A.M. Fainleib, S. De Luca // Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc. – 2018. – Vol. 193. – P. 558–564.

5. Tugarova, A.V. FTIR and Raman spectroscopic studies of selenium nanoparticles synthesised by the bacterium *Azospirillum thioophilum* / A.V. Tugarova, P.V. Mamchenkova, **Yu.A. Dyatlova**, A.A. Kamnev // Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc. – 2018. – Vol. 192. – P. 458–463.

6. Tugarova, A.V. Biochemical study of selenite bioconversion by *Azospirillum brasilense* / A.V. Tugarova, P.V. Mamchenkova, **Yu.A. Dyatlova**, A.A. Kamnev // FEBS Open Bio. – 2018. – Vol. 8. – Suppl. 1. – P. 479–480.

7. Паршина, В.В. ИК-фурье-спектроскопический анализ накопления поли-3-гидроксibuтирата клетками *Azospirillum brasilense* при различной продолжительности культивирования и концентрации аммония в питательной среде / В.В. Паршина, Ю.А. Дятлова, А.В. Тугарова // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. – 2018. – Т. 18. – №. 3. – С. 331–335.

8. Kamnev, A.A. FTIR spectroscopic studies of selenite reduction by cells of the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp7 and the formation of selenium nanoparticles / A.A. Kamnev, P.V. Mamchenkova, **Yu.A. Dyatlova**, A.V. Tugarova // J. Mol. Struct. – 2017. – Vol. 1140. – P. 106–112.

9. Tugarova, A.V. FTIR spectroscopic study of biofilms formed by the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 and its mutant *Azospirillum brasilense* Sp245.1610 / A.V. Tugarova, A.V. Shelud'ko, **Yu.A. Dyatlova**, Yu.A. Filip'echeva, A.A. Kamnev // J. Mol. Struct. – 2017. – Vol. 1140. – P. 142–147.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ДО – диффузное отражение (DRIFT, режим измерения ИК-спектров)

ИК – инфракрасный

ИКФС – инфракрасная фурье-спектроскопия

ПГА – полигидроксиалканоаты (полигидроксиалкановые кислоты)

ПГБ – поли-3-гидроксibuтират

СМС – синтетическая малатная солевая среда

ФР – физиологический раствор (0,85% водный хлорид натрия)