_____ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ____ СТАТЬИ

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА БАКТЕРИЙ ПО СПЕКТРАМ ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ

© 2020 г. О. В. Борисова^{*a*, *}, А. Г. Галстян^{*a*}, А. Ю. Оленин^{*b*}, Г. В. Лисичкин^{*b*}, В. В. Зверев^{*a*}

 $^a \Phi \Gamma ar{b} H Y$ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, 105064 Россия

^b Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119991 Россия *e-mail: olga.v.borisova@gmail.com

Поступила в редакцию 29.03.2019 г. После доработки 29.05.2019 г. Принята к публикации 29.09.2019 г.

Эффект гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) биоорганических соединений вблизи поверхности наночастиц серебра может быть использован для видовой идентификации колоний микроорганизмов. Препараты золя наночастиц серебра с предварительно выращенной единичной колонией микроорганизмов (штаммы *Escherichia coli* 376/2, *Staphylococcus aureus* 25923 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27583 и *Bacillus subtilis* 534) обладают индивидуальными спектрами ГКР, наличие и интенсивность полос в которых коррелируют с видовым составом. Наиболее важные различия между спектрами исследованных 4 штаммов были ассоциированы с полосами при 649–652, 948–950, 1326–1340, 1468 см⁻¹. Применение метода главных компонент в диапазоне 600–1600 см⁻¹ дало сумму факторной нагрузки двух главных компонент, равную 83.53% суммарных различий между спектрами, и показало возможность дифференциальной диагностики четырех видов микроорганизмов.

Ключевые слова: бактерии, гигантское комбинационное рассеяние, наночастицы серебра **DOI:** 10.31857/S0026365620010048

Классическая идентификация микроорганизмов, основанная на выращивании их колоний в питательных средах, обладает двумя существенными ограничениями. Во-первых, продолжительность единичного анализа. Время, необходимое для формирования колонии, ее роста измеряется сутками. Во-вторых, не все микроорганизмы способны к формированию колоний, что затрудняет процесс получения достоверной информации об их присутствии. Это стимулирует развитие альтернативных методов идентификации микроорганизмов. Их основу, как правило, составляют либо специфические взаимодействия микроорганизмов между собой или с компонентами окружающей среды, либо определение продуктов жизнедеятельности, характерных только для них (Adler et al., 2008; Cheng et al., 2012; Havlicek et al., 2013; Bos et al., 2013; Попов и соавт., 2013; Мамонова и соавт., 2015).

Эффект гигантского комбинационного рассеяния (ГКР), возникающий в приповерхностной области наночастиц благородных металлов, может быть использован в анализе биологических объектов, в том числе и микроорганизмов (Stiles et al., 2008; Efrima, Zeiri, 2009; Оленин, Лисичкин, 2011; Singh et al., 2015; Zhou et al., 2015; Zheng et al., 2018; Еремина и соавт., 2018). В качестве субстрата для получения спектров ГКР часто используются наночастицы золота и серебра, однако наночастицы серебра обычно обеспечивают более интенсивные и четкие полосы рассеяния (Cañamares et al., 2008; Sa et al., 2012).

Наиболее распространенным методом получения наночастиц серебра является химическое восстановление нитрата серебра боргидридом или цитратом натрия, гидрохлоридом гидроксиламина и другими восстанавливающими агентами, приводящее к образованию золей с разными размерами частиц в зависимости от условий эксперимента. Теоретически доказано и подтверждено экспериментально, что наличие двух или более агрегированных наночастиц может привести к усилению рамановского сигнала по сравнению с сигналом от индивидуальных частиц. Агрегация наночастиц, необходимая для повышения чувствительности, происходит, в частности, за счет добавления хлорида натрия, и ее степень зависит от концентрации соли (Petryayeva, Krull, 2011; Kruszewski, Cyrankiewicz, 2012).

Большинство исследователей сходятся во мнении, что спектры ГКР бактерий определяются компонентами клеточной стенки, такими как пептидогликан, липополисахариды, липиды, мембранные белки, нуклеиновые кислоты, тейхоевые

№	AgNO ₃ , ммоль	NaBH ₄ , ммоль	Na ₃ Cit, ммоль	Температура реакции, °С	Объем конечного золя, мл	Концентрация золей серебра, ммоль/л
1	0.12	0.12	0.24	20	120	1.0
2	0.03	0.015	0.06	4	30	1.0
3	0.03	0.015	0.06	20	30	1.0
4	0.03	_	0.06	90	30	1.0

Таблица 1. Условия получения и характеристики водных золей серебра. Продолжительность реакции 10 мин, концентрация наночастиц серебра 1 ммоль/л

кислоты (Walter et al., 2011; Sivanesan et al., 2014; Zhou et al., 2014). Также предполагается, что маленькие молекулы, такие как аденин, могут вносить вклад в спектры ГКР бактерий (Kahraman et al., 2011; Wu et al., 2015). Идентификация даже чистых культур микроорганизмов представляет особую проблему ввиду сложного, и в тоже время схожего, химического состава их поверхностных элементов, использование хемометрических подходов анализа первичной информации в ряде случаев позволяет получать дополнительную информацию, способствующую решению поставленных задач.

Исходя из изложенного выше, целью настоящего исследования является разработка экспресс-метода детектирования и идентификации бактерий на основе ГКР спектров анализируемых образцов, содержащих наночастицы серебра, включающая оптимизацию условий получения спектров, а также разработку алгоритма обработки первичной спектральной информации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Культивирование штаммов Escherichia coli 376/2, Staphylococcus aureus 25923, Pseudomonas aeruginosa ATCC 27583, Bacillus subtilis 534 (ЦКП "Коллекция микроорганизмов III и IV групп патогенности НИИВС им И.И. Мечникова") проводили с использованием мясо-пептонного агара в течение 18–20 ч при 37°С.

Синтез водных золей наночастиц серебра осуществляли путем восстановления нитрата серебра боргидридом или цитратом натрия. В случае использования боргидрида натрия в исходную реакционную смесь вводили стабилизатор поверхности наночастиц — цитрат натрия. Условия проведения эксперимента и характеристики конечных продуктов приведены в табл. 1. и 2.

Предварительная подготовка образца перед регистрацией спектра ГКР включала смешивание единичной изолированной колонии микроорганизмов с аликвотой (0.115 мл) золя наночастиц, инкубацию в течение 10 мин, внесение аликвоты (0.01 мл) 1 моль/л раствора хлорида натрия до конечной концентрации 0.08 моль/л, тщательное перемешивание полученной массы в лунках 96-луночного планшета.

Регистрацию спектров ГКР проводили на спектрометре (ИнСпектр MIXSplitter, 532 нм) при экспозиции 5000 мс по три повтора в одной точке в разные временные промежутки (от 5 до 40 мин).

Обработку и анализ спектров осуществляли с помощью программного обеспечения OriginPro 9.0 ("OriginLab Corporation").

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оптимизация условий получения ГКР спектров *E. coli* с целью получения стабильного соотношения основных пиков. Метод получения наночастиц серебра сказывается на спектральных характеристиках их конъюгатов с микроорганизмами. Регистрация спектров ГКР с устойчиво разрешенными основными полосами наблюдалась только при использовании наночастиц серебра, полученных путем восстановления нитрата серебра боргидридом натрия в присутствии цитрата натрия в качестве стабилизатора.

Основные полосы спектров ГКР конъюгатов E. coli с наночастицами серебра наблюдались при 649-651, 724-725, 1326-1340 см⁻¹. При восстановлении нитрата серебра в водной среде на поверхности наночастиц могут сорбироваться компоненты реакционной массы (цитрат натрия или продукты его окисления), собственный спектр комбинационного рассеяния которых потенциально может сказываться на конечном результате. На рис. 1 представлены типичные ненормализованные спектры ГКР трехкомпонентных препаратов, содержащих единичную колонию E. coli в присутствии наночастиц серебра и хлорида натрия, а также все двухкомпонентные варианты. Из представленных данных видно, что эффект ГКР возникает только при наличии в системе всех трех составляющих.

Характерные спектры ГКР для *E. coli* регистрировались только в присутствии хлорида натрия. Связанное с этим увеличение интенсивности полос, наиболее вероятно объясняется агрегацией наночастиц серебра, что косвенно подтверждает-

Интенсивность сигнала, отн. ед. 15000 1326 10000 651 0.08 M NaCl + E. coli 4 Ag 5000 E. coli + HY Ag alger 0.08 M NaCl + E. coli 0 0.08 M NaCl + НЧ Аg 600 800 1000 1200 1400 1600 Романовский сдвиг, см⁻¹

Рис. 1. Типичные ненормализованные спектры ГКР суспензий, содержащих *E. coli* 376/2, наночастицы серебра, хлорид натрия.

ся изменением интенсивности и формы спектров поглощения в диапазоне 350—700 нм: пик поглощения наночастиц серебра при 420 нм в присутствии хлорида натрия уширяется, а его интенсивность снижается. Этот факт находится в соответствии с результатами ряда работ, в которых отмечается, что агрегация наночастиц, вызванная различными агентами, — ключевой момент в получении спектров ГКР (Knauer et al., 2010; Kruszewski et al., 2012).

Спектры, фиксируемые для одного и того же образца, с течением времени изменяются и различаются интенсивностью и разрешением основных полос. Для установления оптимального времени регистрации после добавления раствора хлорида натрия в интервале 5–70 мин была произведена последовательная съемка спектров. Результаты представлены на рис. 2. В интервале от 5 до 15 мин наблюдается только изменение интенсивности основных полос поглощения, нормализация спектров дает их практически полное совпадение. При дальнейшей инкубации даже для нормализованных спектров происходит относительное увеличение интенсивности линий в областях 900, 1260, а особенно – 1320 и 1460 см⁻¹.

Результаты, полученные с тремя образцами золей наночастиц, отличающихся средним размером, были аналогичны; в дальнейшей работе использовали образец № 2 (табл. 1 и 2). Также было установлено, что оптимальные условия получения спектров ГКР всех 4-х видов микроорганизмов включают предварительную инкубацию единичной изолированной колонии микроорганизмов с аликвотой золя наночастиц в течение 10 мин и последующее внесение хлорида натрия.

Оценка возможности дифференциального выявления бактерий. В оптимизированных условиях произведена регистрация спектров ГКР для 4 видов микроорганизмов: *E. coli, S. aureus, B. subtilis* и *P. aeruginosa*. Типичные спектры образцов приведены на рис. 3. ГКР-спектры всех анализируемых микроорганизмов имели общий интенсивный пик около 724–725 см⁻¹. Наиболее важные различия между спектрами исследованных патогенов были ассоциированы с полосами при 649–652, 948–950, 1326–1340, 1468 см⁻¹.

Для статистической классификации анализируемых микроорганизмов использовался мультивариантный статистический метод главных компонент. Этот метод позволяет уменьшить размерность набора спектроскопических данных до нескольких,



Рис. 2. Нормализованные спектры ГКР суспензий, содержащих *E. coli* 376/2, наночастицы серебра, хлорид натрия в интервале времен инкубации 5–70 мин.

№	Максимум спектра поглощения, нм	Средний размер частиц, нм
1	392	21
2	391	3
3	389	1.5
4	421	15

Таблица 2. Максимумы спектров поглощения и средние размеры наночастиц золей серебра

обычно 2–3-х, главных компонент, описывающих максимум изменчивости между анализируемыми объектами.

Главные компоненты представляют собой линейные комбинации исходных данных, в данном случае набора нормализированных интенсивностей рассеяния. Перед использованием метода главных компонент все ГКР спектры преобразовывали путем сглаживания, вычитания базового уровня и нормализации по максимальному сигналу. Анализировались данные, представленные максимальными нормализованными интенсивностями рассеяния в диапазоне 620–622, 649–652, 724–725, 1128–1130, 1187, 1245–1246, 1326–1340, 1458, 1468 и 1536 см⁻¹.

Применение метода главных компонент дало сумму факторной нагрузки двух главных компонент, равную 83.53% суммарных различий между спектрами. На рис. 4 приведены рассчитанные методом главных компонент результаты анализа 35 спектров для 4 видов бактерий, где выборки, от-



Рис. 3. Типичные нормализованные спектры ГКР образцов, содержащих различные виды микроорганизмов.

МИКРОБИОЛОГИЯ том 89 № 2 2020

носящиеся к различным типам микроорганизмов, апроксимированы не пересекающимися эллипсами, что показывает возможность дифференциальной диагностики этих микроорганизмов.

Рамановское рассеяние конъюгатов наночастиц серебра с бактериальными клеточными стенками. Специфика возникновения эффекта ГКР состоит в том, что интенсивные рамановские линии в спектрах могут возникать только для сорбатов, находящихся в непосредственной близости от металлической поверхности. С химической точки зрения эти сорбаты должны формировать поверхностные комплексы с атомами серебра. Такие комплексы возможны с функциональными группами биоорганических соединений, составляющих клеточную стенку, количественный состав которой, скорее всего, индивидуален для различных видов бактерий.

Авторами ряда работ (Zhou et al., 2014; Kamińska et al., 2016), исследовавшими взаимодействие наночастиц серебра с бактериями, приводится информация по отнесению линий спектров ГКР к вращательно-колебательным взаимодействиям, происходящих в молекулах, составляющих клеточные стенки бактерий. Эта информация представлена в табл. 3.

С высокой степенью уверенности можно утверждать, что линии в спектрах ГКР при 649–652 см⁻¹ могут быть отнесены к карбоксильным группам жирных кислот, линии при 725, 1326–1340 см⁻¹ – к нуклеотидам (аденину) и ДНК, при 948–950 см⁻¹ – υ (CN), 1468 – δ (CH₂) насыщенных жирных кислот.

Также в процессе работы проводили контроль стабильности золей серебра, осуществляемый путем периодической регистрации спектров малахитового зеленого оксалата в концен-



Рис. 4. Сравнение ГКР спектров четырех видов бактерий методом главных компонент.

Сдвиг линии KP, см ⁻¹	Отнесение	Сдвиг линии КР, см ⁻¹	Отнесение
563	Углеводы	1268	δ(CH ₂) амид III
624	Скелетные колебания ароматического кольца	1330	υ(NH ₂) аденин, полиаденин, ДНК
652	δ(COO-)	1360-1440	υ(СОО–) симметричные
735	Аденин, гликозидное кольцо	1368	υ(СОО–) и δ(С–Н) белков
808	υ(CN) тирозин, порин, валин	1440-1460	$\delta(CH_2)$ насыщенные жиры
955	υ(CN)	1540-1645	Амид II, υ(CN), γ(NH)
1128	Амид III, аденин, полиаденин, ДНК	1640-1680	Амид I
1250-1310	Амид III		

Таблица 3. Соотнесение линий спектров ГКР с колебательно-вращательными взаимодействиями в биомолекулах, составляющих клеточную стенку бактерий

трации 10^{-7} моль/л в присутствии 0.04 моль/л NaCl с использованием наночастиц серебра в концентрации 0.2 ммоль/л в качестве ГКР-субстрата в течение 6 мес. один раз в две недели. Изменения в интенсивности основных пиков при 1171, 1288, 1359 и 1614 см⁻¹ в пределах ±15% показывают, что в течение не менее чем 6 мес. ГКР-свойства наночастиц серебра не меняются.

Таким образом, разработан метод, позволяющий проводить идентификацию микроорганизмов путем сравнения спектра ГКР анализируемого образца с известными бактериальными спектрами. Реализация данного метода требует выбора метода получения изолированных колоний бактерий (Sanders, 2012) применительно к конкретному типу образцов, а также составление библиотеки Спектров ГКР.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование было выполнено за счет средств гранта РНФ № 16-15-10332.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, в которых в качестве объектов использовались люди или животные.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Еремина О.Е., Семенова А.А., Сергеева Е.А., Браже Н.А., Максимов Г.В., Шеховцова Т.Н., Гудилин Е.А., Веселова И.А. Спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния в современном химическом анализе: достижения и перспективы использования // Успехи химии. 2018. Т. 87. С. 741–770. *Eremina O.E., Semenova A.A., Sergeeva E.A., Brazhe N.A., Maksimov G.V., Shekhovtsova T.N., Goodilin E.A., Veselova I.A.* Surface-enhanced Raman spectroscopy in modern chemical analysis: advances and prospects // Rus. Chem. Rev. 2018. V. 87. P. 741–770.

Мамонова И.А., Бабушкина И.В., Норкин И.А., Гладкова Е.В., Матасов М.Д., Пучиньян Д.М. Биологическое действие наночастиц металлов и их оксидов на бактериальные клетки // Российские нанотехнологии. 2015. Т. 10. № 1–2. С. 106–110.

Mamonova I.A., Babushkina I.V., Norkin I.A., Gladkova E.V., Puchin'yan D.M., Matasov M.D. Biological activity of metal nanoparticles and their oxides and their effect on bacterial cells // Nanotechnologies in Russia. 2015. V. 10. \mathbb{N} 1–2. P. 128–134.

Оленин А.Ю., Лисичкин Г.В. Получение, динамика структуры объема и поверхности металлических наночастиц в конденсированных средах // Успехи химии. 2011. Т. 80. С. 635–662.

Olenin A.Yu., Lisichkin G.V. Metal nanoparticles in condensed media: preparation and the bulk and surface structural dynamics // Rus. Chem. Rev. 2011. V. 80. P. 605–630.

Попов Д.А., Овсеенко С.Т., Осипов Г.А., Вострикова Т.Ю. Ускоренный способ идентификации возбудителей бактериемий с применением метода газовой хроматомасс-спектрометрии // Клиническая лабораторная диагностика. 2013. № 5. С. 54–58.

Adler M., Wacker R., Niemeyer C.M. Sensitivity by combination: immuno-PCR and related technologies // Analyst. 2008. V. 133. P. 702–718.

Bos L.D.J., Sterk P.J., Schultz M.J. Volatile metabolites of pathogens: a systematic review // PLoS Pathog. 2013. V. 9. e1003311.

Cañamares M.V., Garcia-Ramos J.V., Sanchez-Cortes S., Castillejo M., Oujja M. Comparative SERS effectiveness of silver nanoparticles prepared by different methods: A study of the enhancement factor and the interfacial properties // J. Colloid Interface Sci. 2008. V. 326. P. 103–109.

Cheng H.-W., Huan S.-Y., Yu R.-Q. Nanoparticle-based substrates for surface-enhanced Raman scattering detection of bacterial spores // Analyst. 2012. V. 137. P. 3601–3608.

Efrima S., Zeiri L. Understanding SERS of bacteria // J. Raman Spectrosc. 2009. V. 40. P. 277–288.

Havlicek V., Lemr K., Schug K.A. Current trends in microbial diagnostics based on mass spectrometry // Anal. Chem. 2013. V. 85. P. 790–797.

Kahraman M., Keseroglu K., Culha M. On sample preparation for surface-enhanced Raman scattering (SERS) of bacteria and the source of spectral features of the spectra // Appl. Spectrosc. 2011. V. 65. P. 500–506.

Kamińska A., Witkowska E., Kowalska A., Skoczyńska A., Ronkiewicz P., Szymborski T., Waluk J. Rapid detection and identification of bacterial meningitis pathogens in *ex vivo* clinical samples by SERS method and principal component analysis // Anal. Methods. 2016. No 8. 4521–4529.

Knauer M., Ivleva N.P., Niessne R., Haisch C. Optimized surface-enhanced Raman scattering (SERS) colloids for the characterization of microorganisms // Anal. Sci. 2010. V. 26. P. 761–766.

Kruszewski S., Cyrankiewicz M. Aggregated silver sols as SERS substrates // Acoust. Biomed. Eng. 2012. V. 121. \mathbb{N} 1 A. P. 68–74.

Petryayeva E., Krull U.J. Localized surface plasmon resonance: Nanostructures, bioassays and biosensing – A review // Anal. Chem. 2011. V. 706. P. 8–24.

Sa Y., Jung L., Jung Y.M. Avidin induced silver aggregation for SERS based Bioassay // Bull. Korean Chem. Soc. 2012. V. 33. P. 3681–3685.

Sanders E.R. Aseptic laboratory techniques: plating methods // J. Vis. Exp. 2012. № 63. e3064.

Singh H.P., Kaur A., Kaur I., Buttar H.S., Bhullar S.K. Gold nanoparticles: a promising therapeutic approach // Biomed. Rev. 2015. V. 26. P. 23–36.

Sivanesan A., Witkowska E., Adamkiewicz W., Dziewit L, Kaminska A., Waluk J. Nanostructured silver-gold bimetallic SERS substrates for selective identification of bacteria in human blood // Analyst. 2014. V. 139. P. 1037–1043.

Stiles P.L., Dieringer J.A., Shah N.C., Van Duyne R.P. Surface-enhanced Raman spectroscopy // Annu. Rev. Anal. Chem. 2008. V. 1. P. 601–626.

Walter A., Marz A., Schumacher W., Rosch P., Popp J. Towards a fast, high specific and reliable discrimination of bacteria on strain level by means of SERS in a microfluidic device // Lab. Chip. 2011. V. 11. P. 1013–1021.

Wu X., Huang Y.-W., Park B., Tripp R.A., Zhao Y. Differentiation and classification of bacteria using vancomycin functionalized silver nanorods array based surface-enhanced Raman spectroscopy and chemometric analysis // Talanta. 2015. V. 139. P. 96–103.

Zheng X.-S., Jahn I.J., Weber K., Cialla-May D., Popp J. Label-free SERS in biological and biomedical applications: recent progress, current challenges and opportunities // Spectrochim. Acta. Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2018. V. 197. P. 56–77.

Zhou H., Yang D., Ivleva N.P., Mircescu N.E., Niessner R., Haisch C. SERS detection of bacteria in water by *in situ* coating with Ag nanoparticles // Anal. Chem. 2014. V. 86. P. 1525–1533.

Zhou W., Gao X., Liu D., Chen X. Gold nanoparticles for in vitro diagnostics // Chem. Rev. 2015. V. 115. P. 10575–10636.

Differential Diagnostics of Bacteria Using the Surface-Enhanced Raman Spectra

O. V. Borisova^{1, *}, A. G. Galstyan¹, A. Yu. Olenin², G. V. Lisichkin², and V. V. Zverev¹

¹Mechnikov Institute of Vaccines and Sera, Moscow, 105064 Russia

²Chemical Faculty, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: olga.v.borisova@gmail.com

Received March 29, 2019; revised May 29, 2019; accepted September 29, 2019

Abstract—Surface-enhanced Raman scattering of bioorganic compounds close to silver nanoparticles may be used for species identification of microbial colonies. The preparations of silver nanoparticles sol with a single microbial colony (strains *Escherichia coli* 376/2, *Staphylococcus aureus* 25923 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27583, and *Bacillus subtilis* 534) exhibited the individual Raman spectra, in which the band occurrence and intensity correlated with the species composition. The most important differences in the spectra of these four strains were associated with the bands at 649–652, 948–950, 1326–1340, and 1468 cm⁻¹. Application of the principal component analysis within the range from 600 to 1600 cm⁻¹ resulted in the sum of the factor load of two major components equal to 83.53% of the total differences between the spectra and demonstrated the possibility of differential diagnostics of four microbial species.

Keywords: bacteria, surface-enhance Raman scattering, silver nanoparticles

МИКРОБИОЛОГИЯ том 89 № 2 2020