

Применение оптических технологий для изучения и идентификации микроорганизмов (обзор)

© А.Н. Спицын¹, Д.В. Уткин¹, О.С. Кузнецов¹, П.С. Ерохин¹, Н.А. Осина¹, В.И. Кочубей^{2,3}

¹ Российский научно-исследовательский противочумный институт „Микроб“ Роспотребнадзора, 410005 Саратов, Россия

² Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, 410012 Саратов, Россия

³ Национальный исследовательский Томский государственный университет, 634050 Томск, Россия

e-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила в редакцию 16.07.2020 г.

В окончательной редакции 14.09.2020 г.

Принята к публикации 28.09.2020 г.

Изучение и идентификация микроорганизмов играет важную роль в диагностике инфекционных болезней, поэтому важной и актуальной задачей является внедрение новых технологий, направленных на усовершенствование проводимых исследований. Получение количественной и качественной информации о бактериях с высокой скоростью, специфичностью, чувствительностью обнаружения, низкой себестоимостью и простотой постановки анализа представляется особенно важным. В данном обзоре рассмотрено применение современных диагностических технологий, позволяющих обеспечить исследование биологических систем с высокой степенью аналитической надежности. Технологии спектроскопии комбинационного рассеяния, ИК фурье-спектроскопии, а также поверхностного плазмонного резонанса, используемых в современных биосенсорах, зарекомендовали себя в качестве значимых и перспективных инструментов исследований. Указаны основные преимущества и недостатки применяемых методов, а также результаты их практического использования. Существенный интерес вызывают современные подходы к изучению микроорганизмов с использованием генетических белковых красителей (GFP) и с применением наноматериалов (тераностика).

Ключевые слова: биосенсоры, бактерии, идентификация, спектроскопия комбинационного рассеяния, ИК фурье-спектроскопия, поверхностный плазмонный резонанс, белок GFP, тераностика.

DOI: 10.21883/OS.2021.01.50446.200-20

В последние годы отмечен растущий интерес к развитию новых подходов к идентификации возбудителей инфекционных болезней при помощи оптических биосенсоров, основанных на применении технологий спектроскопии комбинационного рассеяния (КР), инфракрасной (ИК) фурье-спектроскопии, поверхностного плазмонного резонанса. ИК фурье-спектроскопия и спектроскопия КР являются одними из наиболее часто используемых спектроскопических методов для идентификации биологических макромолекул и бактерий благодаря большому объему информации, предоставляемой их колебательными и вращательными спектрами.

Метод ИК спектроскопии основан на поглощении электромагнитного излучения ИК диапазона молекулами изучаемого вещества, при котором происходит возбуждение колебательных и вращательных состояний [1]. Такое поглощение носит селективный характер и происходит на частотах, соответствующих собственным частотам колебаний атомов в молекулах вещества и с частотами вращений молекул. В результате интенсивность ИК излучения на этих частотах резко падает и образуются полосы поглощения, которые могут быть использованы при идентификации молекул, в том числе для характеристики молекулярной структуры клеток.

Спектроскопия комбинационного рассеяния (КРС) относится к семейству методов колебательной спектроскопии, при которых взаимодействие монохроматического света, излучаемого лазером, с молекулой вещества, находящейся в колебательном состоянии, приводит к самопроизвольному упругому рассеянию света, называемому релеевским [2]. При этом 1 из 10^6 фотонов неупруго рассеивается на оптических частотах, отличных от частот падающих фотонов. В данном случае энергия передается либо от фотона к молекуле (стоксовое рассеяние, Stokes Raman scattering) или от молекулы к фотону (антистоксовое рассеяние, anti-Stokes Raman Scattering). Поскольку стоксовое рассеяние обычно более интенсивно, чем антистоксовое, оно используется для традиционной КРС. Биологические образцы содержат множество различных молекул, следовательно, спектр КР клетки является совмещением спектральной информации обо всех биологических компонентах, находящихся в фокусе лазера.

Поверхностный плазмонный резонанс (Surface Plasmon resonance, SPR) — резонансное возбуждение квантов колебаний электронного газа (плазмонов) электромагнитной (ЭМ) волной в тонком слое проводящего металла, помещенного между двух сред с разными по-

казателями преломления [3]. Поверхностные плазмоны представляют собой поверхностные ЭМ волны, распространяющиеся в направлении, параллельном границе раздела металл-диэлектрик (металл–вакуум), и сильно локализованные у границы раздела сред. Оптические биосенсоры, основанные на эффекте поверхностного плазмонного резонанса, широко применяются для изучения биомолекулярных взаимодействий, детекции химических соединений и при иммуноанализе.

Мировыми лидерами в области спектроскопии КР являются компании Horiba Scientific (Япония), B&W Tek (США), а в области фурье-спектроскопии — Thermo Fisher Scientific, Perkin Elmer, Bruker, Agilent Technologies (США). В России как изделие медицинского назначения зарегистрирован спектрометр лазерный раманлюминесцентный медицинский „ИнСпектр М“ (ООО „ИнСпектр“).

Целью представленной обзорной статьи является рассмотрение практического применения современных оптических технологий для изучения и идентификации микроорганизмов, определение их достоинств, а также проблем использования.

ИК спектроскопия

Попытки применения ИК спектроскопии в микробиологических исследованиях начались уже в 1910-х годах, когда впервые было предложено использование ИК спектроскопии для анализа биологических образцов. К концу 1940-х годов метод был успешно применен для изучения биологических материалов, и, фактически, ИК спектроскопия стала признанным инструментом для исследования биомолекул [4].

Первые коммерческие ИК спектрометры появились в 1957 г., а с середины 1960-х годов разработаны устройства на основе интерферометров Майкельсона с преобразованием Фурье, используемые в настоящее время [5].

Начало применения ИК фурье-спектроскопии для дифференциации и идентификации бактерий относится к 1950-м годам [6–8]. Несмотря на то, что бактерии характеризуются ИК спектрами, уникальными для отдельных штаммов, считалось, что идентификация бактерий посредством ИК техник не может быть рассмотрена в качестве эффективного метода, так как в то время являлась неисполнимой процедурой из-за ограниченных возможностей приборов [9,10]. Только в 1988 г. исследователи вновь предложили использовать этот метод для изучения и идентификации микроорганизмов в связи с появлением спектрометров, позволявших снимать спектры с наибольшим значением отношения „сигнал-шум“ и высоким спектральным разрешением, доступностью недорогих миникомпьютеров и новых мощных алгоритмов для многопараметрического статистического анализа и методик распознавания образов [11–13]. Было установлено, что ИК спектры бактерий могут

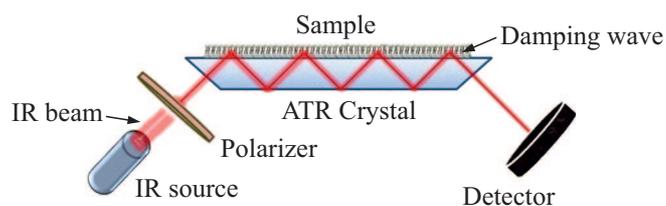


Рис. 1. Схематическое представление FTIR-ATR-анализа. ИК пучок подвергается общему внутреннему отражению в кристалле, и затухающая волна взаимодействует с образцом [20].

быть использованы для их идентификации [14] и дифференциации [15], а ИК фурье-спектроскопия является значимым инструментом для изучения биологических макромолекул [16] и сложных биологических систем, таких как ткани и бактериальные клетки [17–19].

В большинстве публикаций для успешной идентификации микроорганизмов широкое применение получила ИК фурье-спектроскопия с нарушенным полным внутренним отражением (Fourier transform infrared spectroscopy with attenuated total reflection FTIR-ATR). При нарушенном полном внутреннем отражении ИК пучок подвергается общему внутреннему отражению в кристалле, и сгенерированная затухающая волна взаимодействует с образцом (рис. 1) [20]. Результатом является ИК спектр, отражающий весь химический состав пробы. Как правило, ИК спектр биологического материала состоит из характерных полос липидов ($3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$), протеинов/амидов I и II ($1700\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$), фосфолипидов/ДНК/РНК ($1500\text{--}1185\text{ cm}^{-1}$), полисахаридов ($1185\text{--}900\text{ cm}^{-1}$) и уникальной области идентификации, получившей название „отпечатков пальцев“ (fingerprint, $900\text{--}600\text{ cm}^{-1}$).

Для обработки полученных спектральных данных применяются различные методы многопараметрического анализа, такие как метод главных компонент PCA (Principal component analysis), метод мягкого независимого моделирования аналогий классов (Soft independent modeling of class analogy, SIMCA), иерархический кластерный анализ (Hierarchical clustering analysis, HCA), канонический вариационный анализ (Canonical variate analysis, CVA), факторный дискриминантный анализ (Factor discriminant analysis, FDA), дискриминантный анализ методом частичных наименьших квадратов (Partial least squares discriminant analysis, PLS-DA) и др. [21]. Анализ литературных данных показал, что обработка FTIR-спектров становится более эффективной с использованием методов машинного обучения и математических моделей искусственных нейронных сетей (Artificial neural network, ANN) [22].

Проведение успешной идентификации бактерий требует того, чтобы условия роста, такие как время инкубации и состав питательной среды, были постоянными. Контроль этих параметров осуществляется путем выращивания бактерий на агаровых средах общего назначения

ния с последующим отбором колоний, находящихся в поздней экспоненциальной или стационарной фазе роста. Затем микроорганизмы, удерживаемые на подложке, помещаются перед ИК пучком. Образец обычно наносится в виде пленки, созданной солевым или водным раствором, которому дают возможность высохнуть в вакууме на нерастворимом в воде кристалле, прозрачном для ИК излучения. Самым распространенным выбором является использование кристаллов ZnSe, а также BaF₂, CaF₂ [23].

С помощью спектроскопии FTIR были исследованы грамотрицательные (Грамм(-)) бактерии родов *Acinetobacter*, *Burkholderia* и *Yersinia*.

Род *Acinetobacter* включает в себя несколько близкородственных видов, и их точная идентификация остается одной из проблем в микробиологии. Разработан алгоритм для идентификации четырех видов внутри так называемой группы *Acinetobacter calcoacticus* — *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*, *A. nosocomialis*, *A. pittii*, *A. calcoacticus*), основанный на FTIR-ATR-спектроскопии и НСА со специфичностью от 90 до 100% [24].

Из проб биологического материала при кистозном фиброзе было выделено несколько штаммов, относящихся к группе бактерий *Burkholderia cepacia*. Разработанная система FTIR-идентификации с использованием ANN позволяла проводить дифференциацию представителей *B. cepacia* и других Грамм(-)-бактерий [25]. Система состояла из двух иерархических уровней. На первом уровне было возможным проводить определение *B. cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Acinetobacter* spp., *Ralstonia pickettii* со специфичностью 98.1%. Вторым уровнем позволял дифференцировать четыре вида группы *B. cepacia* (*B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. stabilis*) со специфичностью 93.8%.

Проведена успешная идентификация видов *Yersinia* (*Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. bercovieri*, *Y. Intermedia* и др.) на основе ИК спектров и ANN [26]. Специфичность анализа для *Y. enterocolitica* составила 78.7%.

Проведена дифференциация трех родов семейства *Enterobacteriaceae*: *Xenorhabdus*, *Photorhabdus* и *Escherichia* посредством совместного использования FTIR-ATR- и хемометрического анализа, который показал, что существенные спектральные различия связаны с колебаниями молекул фосфатов и углеводов. Методы PCA и НСА позволили выявить три отдельных кластера, каждый из которых содержал бактерии одного отдельного рода [27].

Бактерии *E. coli* [28] и *A. baumannii* [29] были успешно идентифицированы в соответствии с их сиквенс-типами посредством ИК спектроскопии и хемометрии со специфичностью до 91.19 и 100% соответственно.

Исследована возможность идентификации Грамм(-)-клонов бактерий (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter baumannii*) с помощью FTIR-спектроскопии [30].

Было установлено, что FTIR-спектроскопия точно кластеризовала штаммы *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, принадлежащие одному и тому же сиквенс-типу. Эффективность FTIR-спектроскопии оказалась немного ниже для *A. baumannii*. Кроме того, также были точно кластеризованы штаммы *P. aeruginosa*, имеющие схожий белковый спектр.

Оценена эффективность FTIR-спектроскопии для идентификации клинических штаммов *E. cloacae*, в то время как метод полногеномного секвенирования использовался в качестве контрольного [31]. Анализ 239 штаммов *E. cloacae* посредством FTIR-спектроскопии и ANN позволил проводить идентификацию со специфичностью 97%.

Проведен анализ штаммов бактерий рода *Proteus* spp. с использованием FTIR-ATR-спектроскопии в средней ИК области (4000–900 см⁻¹) [32]. FTIR-ATR-спектроскопия совместно с алмазным кристаллом напрямую предоставляла информацию о биохимическом составе поверхности бактерий, что позволяло устанавливать различия между штаммами *Proteus mirabilis* в зависимости от их липополисахаридной структуры.

FTIR-спектроскопия была использована для анализа сульфат- и тиосульфатредуцирующих бактерий в процессе биокоррозии с помощью создания референсной библиотеки спектров [33]. Анализ полученных данных позволил успешно распознавать сульфатредуцирующие штаммы на уровне рода.

Дифференциация грамположительных (Грамм(+)) бактерий на основе ИК спектроскопии была полно изучена в отношении родов *Listeria* и *Bacillus*, начиная с работ конца 90-х годов XX века. Показана успешная идентификация 6 видов *Listeria* (*L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*) с использованием FTIR и CVA [34], а при изучении 277 штаммов пяти видов листерий удалось достичь 96% специфичность анализа с использованием ANN [35]. Установлено, что на результаты исследования сильное влияние имели состав культуральной среды, время роста, температура и процедура очистки перед проведением FTIR-анализа. В более полном исследовании представлен метод дифференциации двенадцати серотипов *L. monocytogenes* со специфичностью определений в диапазоне от 91.6 до 98.8% в зависимости от серогруппы [36]. Первая попытка проведения видового различия рода *Bacillus* была осуществлена, когда четыре подвида *Bacillus cereus* были дифференцированы среди других *Bacillus* spp. путем сравнения ИК полос поглощения [37]. В это же время представлена работа по идентификации *B. cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus* и *Bacillus subtilis* с использованием метода FTIR-спектроскопии и CVA [38]. Установлено, что FTIR-спектроскопия в сочетании с хемометрическими методами является эффективной для идентификации видов *Bacillus pumilis*, *Bacillus safensis*, *Bacillus altitudinis* и *Bacillus xiamenensis* [39].

Проведено изучение влияния условий культивирования *B. subtilis* ИМБ В-7023 и его стрептомицинустойчивого мутанта в среде с глицерофосфатом на свойства поверхности клеток методом FTIR-спектроскопии [40]. Полученные данные свидетельствуют об изменениях в характеристиках интенсивности пиков ИК спектров, когда в зависимости от источника углеродного питания происходило перераспределение функциональных групп, в основном отвечающих за амидную (белковую) группу NH–CO и простую эфирную связь C–O, а также группы P–O и P–O–C.

Изучена возможность применения FTIR-спектроскопии для оценки предполагаемых биохимических и структурных различий между двумя вариантами плеоморфного штамма *Lactobacillus farciminis* [41]. Основные наблюдаемые различия морфотипов были локализованы в полисахаридной и белковых областях спектрального диапазона. Анализ FTIR-спектров дифференцировал колонии S-морфотипа как вязкие и экзополисахарид-продуцирующие, а колонии R-морфотипа — не вязкие, но высокоагрегативные.

Первые работы, использовавшие ИК излучение в сочетании с кластерным анализом для идентификации представителей *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. и *Clostridium* spp. относятся к началу 90-х г. XX в. [42]. Показано, что FTIR-спектроскопия может улучшить диагностику мастита, связанного с видами *Streptococcus* [43]. Специфичность идентификации клинических изолятов из молока коров составила 100%.

Представлены ИК профили пробиотических штаммов *Streptococcus salivarius* K12 (SsK12), характеризующие структурные компоненты клеток [44]. Данная информация способствует созданию пробиотических функциональных продуктов питания, обогащенных необходимым количеством жизнеспособных бактерий.

FTIR в сочетании с соответствующими хемометрическими методами позволил дифференцировать несколько серотипов *Streptococcus pneumoniae* [45], *Staphylococcus aureus* [46] с показателем специфичности 100 и 98,2%.

Сравнительное исследование эффективности идентификации шести видов *Enterococcus* с использованием фенотипических, генетических методов и ИК спектроскопии позволило установить, что FTIR-спектроскопия с НСА-обработкой данных обеспечивает видовую дифференциацию данных бактерий [47]. *S. aureus* также был успешно дифференцирован от других видов *Staphylococcus* с использованием FTIR и FDA [48].

Существует также метод идентификации и дифференциации бактерий видов *Lactococcus* и *Enterococcus* на уровне рода и вида, основанный на сборе спектров в ближней ИК области непосредственно из бактериальных колоний в чашках Петри [49]. Специфичность метода составила 87%.

Метод ИК спектроскопии использовали для определения деструктивной активности нефтеокисляющих микроорганизмов *Corynebacterium* spp., *Dietzia maris*,

Bacillus sp. по остаточному содержанию нефтяных углеводородов путем снятием ИК спектров гексадексана [50].

Исследована возможность применения FTIR-спектроскопии для распознавания возбудителя мастита *Trueperella pyogenes*, выделенного из коровьего молока [51]. FTIR-анализ с помощью ANN позволил осуществить достоверную идентификацию 57 штаммов *T. pyogenes* и четкое отделение образцов этого вида от других видов рода *Trueperella*, а также образцов родов *Arcanobacterium* и *Actinomyces*.

Достигнута 100% дифференциация наиболее часто встречающихся видов Грам(+)-бактерий (*S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium*) и около 80% точность для Грам(-)-бактерий (*Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Klebsiella* spp., *Citrobacter koseri*, *P. mirabilis*, *E. coli*, *Salmonella enterica*, *Yersinia* и *Shigella*) методом FTIR и PCA или CVA [52,53].

FTIR-ATR-спектроскопия была использована для идентификации и дифференциации штаммов *Alicyclobacillus* и *Bacillus*, инокулированных по отдельности в яблочный сок [54]. Исследование, проведенное путем анализа спектров методами PCA и SIMCA, позволило устанавливать различие между штаммами, принадлежащим подвидам *Bacillus* и *Alicyclobacillus*, с чувствительностью от $1.1 \cdot 10^5$ до $7.8 \cdot 10^6$ CFU/ml и специфичностью 78 и 79% соответственно.

Проведено выявление нескольких видов (*S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, *Y. enterocolitica*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *E. coli*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus* и *Vibrio parahaemolyticus*) посредством SIMSA и PCA через их профиль метиловых эфиров жирных кислот, полученный FTIR [55].

Представлен новый метод бактериальной идентификации с использованием многопараметрического анализа FTIR-спектров бактериальной геномной ДНК [56]. В ходе исследования были получены FTIR-спектры геномных ДНК четырех типовых штаммов *Pseudomonas* spp., трех штаммов *Escherichia* spp., двух штаммов *Bacillus* spp. Установлены спектральные различия в области частот валентных колебаний групп N–H (амид I), валентных колебаний C=O (амид II) и ионизированных асимметричных и симметричных валентных колебаний PO_2^- . Дискриминантный анализ по методу частных наименьших квадратов спектров FTIR показал, что штаммы микробов могут быть дифференцированы с помощью анализа НСА. Данный метод потенциально применим для быстрой идентификации бактерий на уровне рода и вида.

Проведено исследование и идентификация пигментированных фоторецептор-продуцирующих микроорганизмов с использованием FTIR-спектроскопии [57]. Установлено, что штаммы *Kushneria marisflavi*, *Halobacillus halophilus*, *Halobacillus faecis* были схожи. Результаты исследований показали, что иерархическая кластеризация, основанная на экстрагированных пигментах, демон-

стрирует более отчетливую дифференциацию штаммов, чем основанная на интактных клетках. Сделано предположение, что FTIR-анализ бактериальных пигментов является простым и экономичным методом, сравнимым с филогенетическими маркерами для идентификации и характеристики бактерий.

Основными преимуществами методов на основе ИК спектроскопии являются высокая чувствительность (менее 10^3 CFU/ml), быстрота проведения анализа (в течение нескольких минут), низкая себестоимость, лабораторная простота, отсутствие химических реагентов. Также микробные ИК спектры содержат соответствующую информацию о биомолекулярном составе микроорганизмов, включая липиды, углеводы, белки и нуклеиновые кислоты. Однако ИК спектроскопия для проведения бактериального типирования обычно требует высокого уровня стандартизации касательно условий роста и питательных сред. ИК спектроскопия является крайне ограниченной касательно жидких образцов (например, бактериальных суспензий), так как вода в ИК области обладает сильным поглощением. В данном случае не удастся получить подробную информацию о химическом составе бактерий из-за низкого спектрального разрешения и недостаточного количества анализируемого материала, поэтому для проведения качественного и количественного анализа необходимо сконцентрировать пробу, удалив из нее излишки воды. Нехватка ИК библиотек не позволяет использовать этот метод для рутинного анализа. Несмотря на эти ограничения, интерес к данному методу для бактериального определения заметно вырос, доказательством этого служит увеличение числа исследовательских работ.

Спектроскопия КР

С момента открытия эффекта КРС в 1928 г. [58] метод спектроскопии КР до начала 1970-х г. не находил широкого применения для исследования биологических объектов. Однако развитие технологий в данной области сделало это возможным благодаря использованию рубинового лазера в качестве источника света в КР-спектрометрах и сопутствующей фотоэлектрической детекции рассеянного света, что позволило проводить исследование проб объемом менее 1 ml, повысить скорость и воспроизводимость спектроскопического анализа. В настоящее время, КР-спектроскопия в полной мере реализует свой потенциал в качестве высокоинформативного метода исследования биомолекул.

КРС имеет ряд преимуществ колебательных методов, таких как отсутствие или незначительная подготовка образца, прямой и неразрушающий способ анализа проб, возможность проводить исследования в присутствии воды, что не искажает спектры, в отличие от ИК спектров.

Если система переводится не в виртуальное, а в существующее электронное возбужденное состояние, результирующее резонансное КР до шести порядков

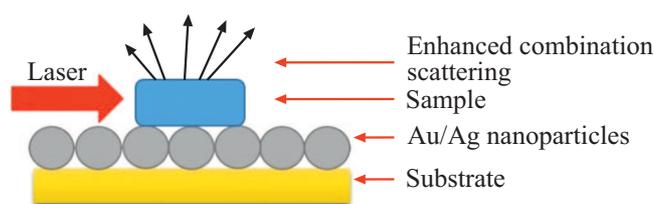


Рис. 2. SERS-подложка с металлическими наночастицами. Происходит увеличение интенсивности сигнала КР до 15 порядков [59].

является более интенсивным, чем нормальное КР. Резонансный КР-спектр бактерии избирательно усиливает КР-колебательные моды молекул, которые поглощают в спектральной области приложенной длины волны возбуждения. Для усиления сигнала видимого возбуждения используются в основном хромофоры, такие как каротиноиды или цитохромы. Преимущественно сигналы от оснований ДНК/РНК или ароматических аминокислот могут быть обнаружены в резонансном КР-спектре, используя УФ возбуждение. КР иногда нарушается флуоресценцией, которая обычно на несколько порядков более интенсивна, чем нормальное КР. Так как биомолекулы и биологические системы обычно содержат флуорофоры, они часто проявляют флуоресценцию, особенно когда исследуются видимыми длинами волн возбуждающего излучения. Следовательно, КР-спектр преимущественно затемняется при возбуждении светом в видимом диапазоне.

Важной задачей для изучения биомолекул и микроорганизмов является увеличение порогового значения чувствительности применяемого метода. С развитием нанотехнологий с целью усиления сигнала КР стала применяться SERS-спектроскопия поверхностно-усиленного КР-рассеяния (surface enhanced Raman scattering). При этом способ взаимодействия мелких металлических частиц или шероховатых металлических поверхностей (SERS-подложек) с молекулой-мишенью приводит к увеличению интенсивности сигнала до 15 порядков (рис. 2) [59]. Обычно золото и серебро используются в качестве SERS-подложек в видимой или ближней ИК области возбуждения. Уникальные оптические свойства золотых наночастиц и других частиц благородных металлов обусловлены локализованным плазмонным резонансом, возбуждаемым падающим ЭМ излучением, когда плазмонные возбуждения приводят к резонансно-усиленным локальным полям и возникновению различных резонансных оптических эффектов, таких как SERS [60]. В то же время, поскольку происходит усиление только колебательных мод молекул, перпендикулярных поверхности SERS-подложки и может произойти значительный сдвиг диапазона частот, спектры SERS возможно будут отличаться от соответствующих КР-спектров. Поскольку размер и форма SERS-подложек существенно влияют на получаемые спектры, SERS-

спектры одного и того же вида, измеренные с разными подложками, иногда не похожи друг на друга. Тем не менее есть попытки стандартизировать SERS-исследования с коммерческими SERS-подложками или микрожидкостными методами.

Кроме того, область модификации SERS-подложки ограничена несколькими нанометрами, следовательно, расположение SERS-подложек относительно бактериальной клетки важно для получения спектральной информации. SERS-подложки на поверхности бактериальной клетки контролируют клеточную стенку или внешнюю мембрану, тогда как металлические наночастицы, расположенные внутри клетки, предоставляют информацию о протоплазме или ДНК. Тем не менее расположение SERS-активных частиц внутри клеток более или менее произвольно, и они распределены неравномерно. Кроме того, существует возможность проводить их не прямое определение методом SERS. В данном случае, SERS-подложка содержит одновременно как маркерную молекулу, так и молекулу захвата, и, таким образом, отслеживается отсутствие или присутствие этой маркерной молекулы.

Наилучшим методом пробоподготовки для КРС является культивирование возбудителя с выделением чистой культуры. Однако данный процесс требует значительного количества времени (от нескольких часов до суток), поэтому при работе с природными или клиническими пробами исследования могут проводиться без предварительной пробоподготовки. Другим методом выделения и очистки образца является фильтрация через нанопористые мембраны. Так, проведение SERS-анализа происходит с предварительной конъюгацией бактерий со специфическими антителами, мечеными металлическими наночастицами. Далее конъюгированные бактерии проходят фильтрацию через нанопористые мембраны, оставаясь на поверхности фильтра, в то время как несвязанные частицы проходят через нее. Еще одним методом детекции биомолекул и обогащения проб является дифференциальное центрифугирование, разделяющее бактериальные клетки в растворах с градиентом плотности, с учетом массы и размеров биомолекул. Концентрирование проб также осуществляется на основе диэлектрофореза с использованием нелинейных электрокинетических явлений для исследования поверхностных свойств бактерий. В таблице приведены примеры применения КРС для решения клинических задач с различными методами пробоподготовки, что обеспечивает различную чувствительность и время проведения анализа [61].

Разработаны комбинированные диэлектрические и металлические резонаторы, предназначенные для получения усиления сигнала неупругого рассеяния света до $2 \cdot 10^8$ [62]. Диэлектрические резонаторы создавались на подложках Si/SiO₂, на которых с помощью электронной литографии и плазменного травления изготавливались периодические структуры (квадратные столбики из SiO₂

высотой 10–200 nm) с планарным размером a (и периодом $2a$), изменявшемся в интервале от 50 до 1500 nm. Для создания комбинированного диэлектрического и металлического резонатора на изготовленную периодическую диэлектрическую структуру методом термического напыления наносился наноструктурированный слой серебра.

Разработан портативный захватывающий бактерии SERS-чип для идентификации трех видов уropатогенных бактерий *E. coli* CFT 073, *P. aeruginosa* PAO1 и *Proteus mirabilis* PRM1 непосредственно из культуральных сред [63]. Для проведения SERS-анализа в специально подготовленные лунки на очищенной аminosилизированной стеклянной поверхности, содержащей NH₃⁺-группы, вносили суспензии бактерий и смешивали с серебряными наночастицами. С помощью хемометрического метода, а именно дискриминантного анализа, удалось достичь необходимой для клинической диагностики чувствительности $1 \cdot 10^5$ CFU/ml.

Проведена модификация клеток *E. coli* нанопленками и серебряными наночастицами для усовершенствования техники SERS [64]. Суспензии покрытых полиэлектролитными пленками и обработанных наночастицами серебра клеток наносили на поверхность CaF₂-подложек с последующим высушиванием азотом. Было установлено, что спектры модифицированных наноматериалами бактерий содержат характерные для вида пики, обусловленные составом клеточной стенки бактерий, при этом сигнал КР характеризовался высокой воспроизводимостью.

КР-спектроскопия была использована для выявления штаммов *E. coli*, *Serratia marcescens*, *Micrococcus luteus*, бактериальных компонентов, таких как белки, ДНК, а также для определения соотношения живых и мертвых клеток этих бактерий до и после воздействия УФ излучения [65]. Новые полосы колебаний и изменения их интенсивности в зависимости от времени воздействия УФ излучения были зарегистрированы с помощью КРС высокого разрешения, что позволило определить механизм УФ инактивации данных бактерий в солевых растворах.

Продемонстрирована возможность быстрого определения чувствительности к антибиотикам на основе использования КР-спектров, полученных от одиночных бактериальных клеток [66]. После двухчасового этапа прекультивирования один восприимчивый и два резистентных штамма *E. coli* были проинкубированы в течение двух часов в присутствии различных бактерицидных антибиотиков (гентамицин, ципрофлоксацин, амоксициллин) в диапазоне концентраций, включающих клинические контрольные точки, используемых в качестве контрольных в микробной диагностике. Обработка полученных спектров позволила определить спектральные изменения, связанные с влиянием антибиотиков.

Впервые посредством прямого обнаружения бактериальных летучих органических соединений VOC (volatile organic compounds) посредством SERS проведена идентификация клинически значимых бактерий *E. coli*,

Примеры применения КРС для решения клинических задач [61]

Пробоподготовка	Биосубстраты	Патогены	Концентрация, CFU/ml	Время исследования
Фильтрация	Молоко, сыворотка крови	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	$5 \cdot 10^2$	До 30 min
Культивирование	Синовиальная жидкость	<i>S. aureus</i> , <i>S. pyogenes</i>	$10^2 - 10^3$	60 min
Культивирование	Сыворотка крови	<i>S. typhi</i>	10^3	2 h
Без пробоподготовки	Биопленка	<i>P. aeruginosa</i>	$10^3 - 10^4$	1.5 h
Центрифугирование	Мокрота, моча	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	10^3	2 h
Центрифугирование	Мокрота	<i>K. pneumoniae</i>	$10^3 - 10^4$	60 min
Без пробоподготовки	Отделяемое из уретры	<i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	$10^1 - 10^2$	1–1.5 h

E. cloacae и *S. marcescens* [67]. При проведении эксперимента отбор VOC, синтезируемых бактериями, происходил путем абсорбции на подложки с наночастицами золота, при помещении их в пробирку с суспензией клеток или на агаровую поверхность чашки Петри. В результате проведенный SERS-анализ позволял выявлять *E. coli* с чувствительностью $1 \cdot 10$ CFU/ml менее чем за 12 h из цельной крови человека и 16 h из мочи при клинически значимых концентрациях 10^3 и 10^4 CFU/ml соответственно. Кроме того, появившиеся в недавнее время портативные КР-спектрометры (Hamamatsu C12710 (Campbell CA), Sierra 2.0 (Snowy Range Instruments, Laramie, WY)) позволяют проводить SERS-обнаружение VOC в местах оказания медицинской помощи для диагностики бактериальных инфекций.

Два характерных Грам(+)-видов бактерий *L. casei* и *L. monocytogenes* были охарактеризованы на основе КРС и SERS-измерений [68]. SERS-спектры были использованы для идентификации биохимических структур бактериальных клеточных стенок. Бактерии были успешно дифференцированы при использовании многопараметрического анализа методом PCA к их характерным спектральным данным.

Определены спектральные сдвиги КР-спектров, соответствующие различным состояниям клеточного роста *L. Casei* Zhang, отражающие биохимические изменения, специфичные фазам роста клеток [69]. КР-пики, связанные с ДНК и РНК, показали снижение интенсивности с течением времени, тогда как белково-специфичные и липидо-специфичные колебания возрастали с различной интенсивностью. Для определения различных фаз клеточного роста использовалась классификационная модель (Random Forest), при этом чувствительность и специфичность метода составили 90.7 и 90.8% соответственно.

Метод SERS на основе сферических наночастиц золота без покрытия в качестве подложки применялся для детектирования и дифференциации трех различных бактериальных штаммов: Грам(+) *B. subtilis*, *Lactobacillus rhamnosus GG* и Грам(-) *E. coli* [70]. Анализ SERS-спектров бактерий с помощью многомерного анализа данных методами PCA и PLS-DA доказал надежность разработанного метода. Проведенное сравнение эффективности разработанного SERS-подхода с традиционным применением серебряных наночастиц свидетельствовало об улучшении сигнала бактерий, который для *E. coli* оказался в 15 раз выше. По всей вероятности, это происходит из-за более сильного взаимодействия наночастиц золота с такими компонентами клетки, как молекулы пурина, дающих доминирующие полосы в бактериальных SERS-спектрах.

Эффект гигантского КР и SERS-подложки с наночастицами серебра использовали для индикации и идентификации микроорганизмов, контрольных (референтных) штаммов *P. aeruginosa* 27853, *S. aureus* 25953 и клинических культур *Staphylococcus*, *Bacillus*, *E. coli* [71]. Измерения проводили после нанесения на SERS-подложки суспензий клеток микроорганизмов капельным методом. Установлено, что каждый вид бактерий характеризовался индивидуальными спектральными КР-линиями, что позволяет проводить идентификацию в течение 1–2 min. Чувствительность метода составила $10^4 - 10^6$ CFU/ml.

Проведенный анализ КР-спектров бактерий *E. coli*, *P. aeruginosa* посредством построенной модели на основе метода линейного дискриминантного анализа LDA (Linear discriminant analysis) позволил провести идентификацию штаммов, обработанных субингибирующими концентрациями ампициллина, ципрофлоксацина, гентамицина и сульфаметоксазола, со специфичностью 85.4, 95.3, 89.9 и 97.3% соответственно [72].

Большинство из приведенных исследований ведущих научных группы мира в области КР-мониторинга для проведения классификации патогенов в реальных лабораторных или клинических исследованиях происходят с использованием методов машинного глубокого обучения (deep learning).

Машинное обучение предоставляет беспрецедентную возможность извлекать информацию из сложных или больших наборов данных, особенно характерных для спектров комплексных биохимических соединений, получаемых методом SERS-КР-спектроскопии, когда обработка информации с помощью классических линейных методов не представляется возможной [73]. Наиболее распространенными методами контролируемого машинного обучения являются метод опорных векторов (Support vector machine, SVM), метод наивного Байеса (naïve Bayes, NB), метод случайного леса (Random forest, RF), метод k -ближайших соседей (k nearest neighbor, KNN) [74].

Глубокое обучение является областью машинного обучения, которая рассматривает методы решения задач искусственного интеллекта с использованием глубоких нейронных сетей. Глубокое обучение позволяет обучать модель предсказывать результат по набору входных данных.

Получен и проведен анализ широкого набора КР-спектров с использованием deep learning – сверточной нейронной сети (Convolutional neural network, CNN), позволивший идентифицировать 30 распространенных бактериальных патогенов родов *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Klebsiella* spp. и др. [75]. Архитектура CNN состояла из 25 одномерных сверточных слоев и остаточных соединений. Пробоподготовка осуществлялась путем нанесения суспензий бактерий на стеклянную подложку с наночастицами золота и последующим высушиванием. Специфичность проведения анализа составила 82%.

SPR (поверхностный плазмонный резонанс)

Первое зарегистрированное наблюдение поверхностных плазмонов произошло в 1902 г., когда при освещении белым светом лежащей на стекле металлической дифракционной решетки отсутствовало отраженное излучение при определенных частотах излучения и углах падения [76]. Открытие SPR-эффекта связано с представленным в 1960-х г. методом нарушенного полного отражения [77,78]. Практическое SPR-детектирование было впервые применено для биомолекулярного обнаружения в 1983 г. [79]. С того времени SPR-биосенсоры получили быстрое развитие и в последние два десятилетия стали важной платформой для качественных и количественных измерений биомолекулярных взаимодействий с преимуществами высокой чувствительности (до $1 \cdot 10^2$ CFU/ml),

разнообразием выбора молекул мишени и детектированием в режиме реального времени. По этой причине SPR-сенсоры получили широкое применение для нужд биологии, анализа качества и безопасности пищевых продуктов, медицинской диагностики.

Для проведения SPR-анализа необходима процедура модификации сенсорной поверхности с помощью иммобилизации рецепторных молекул (антител, пептидов, нуклеиновых кислот) [80]. Далее, на модифицированной поверхности, являющейся границей раздела фаз (стеклянная призма/жидкость), проводятся реакции специфического взаимодействия лиганд–аналит с регистрацией массопереноса аналита между средой и зоной измерения. Это осуществляется путем слежения за изменением резонансного угла, величина которого пропорциональна коэффициенту преломления в поверхностном слое (рис. 3) [81].

С использованием SPR-техники была осуществлена быстрая, чувствительная, высокоспецифичная детекция *Salmonella enteritidis* [82]. Антитела к *S. enteritidis* были иммобилизованы на золотой сенсорной поверхности, и в ходе исследования бактериальных суспензий возбудителя с различной концентрацией удалось определить, что чувствительность анализа составляет $1 \cdot 10^2$ CFU/ml.

Проведено исследование по разработке SPR-сенсорной платформы для обнаружения *C. jejuni* [83]. Сенсорные SPR-чипы были сначала функционализированы поликлональными антителами к *C. Jejuni* с использованием ковалентного связывания. Чувствительность выявления в прямом формате составила $8 \cdot 10^6$ CFU/ml. В дальнейшем удалось повысить чувствительность до $4 \cdot 10^4$ CFU/ml посредством использования „сэндвич“-анализа с использованием тех же поликлональных антител.

Показана возможность быстрой детекции *S. typhimurium* при помощи портативного SPR-биосенсора, в котором пучок от диодного лазера модулировался вращающимся зеркалом [84]. Используя данную систему, проведен иммуноанализ, основанный на использовании моноклональных антител на золотой поверхности чипа. Для иммобилизации моноклональных антител против липополисахаридов (ЛПС) *Salmonella* применялся очищенный цистеин-меченый G-белок. Чувствительность проведенного анализа составила от $1 \cdot 10^7$ до $1 \cdot 10^9$ CFU/ml при времени детекции в течение 1 h в режиме реального времени. Удалось повысить чувствительность детектирования *S. typhimurium* до $1 \cdot 10^6$ CFU/ml в фосфатно-солевом буфере (PBS) и сократить время проведения анализа до 6–7 min с помощью иммобилизации моноклональных антител на модифицированном органическими веществами (комбинация 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодимид и N-гидроксиsuccинимид) самособирающемся монослое, ковалентно связанном с тонкой пленкой золота [85].

Недорогой и высокоэффективный SPR-сенсор был разработан для выявления *E. coli* с использованием

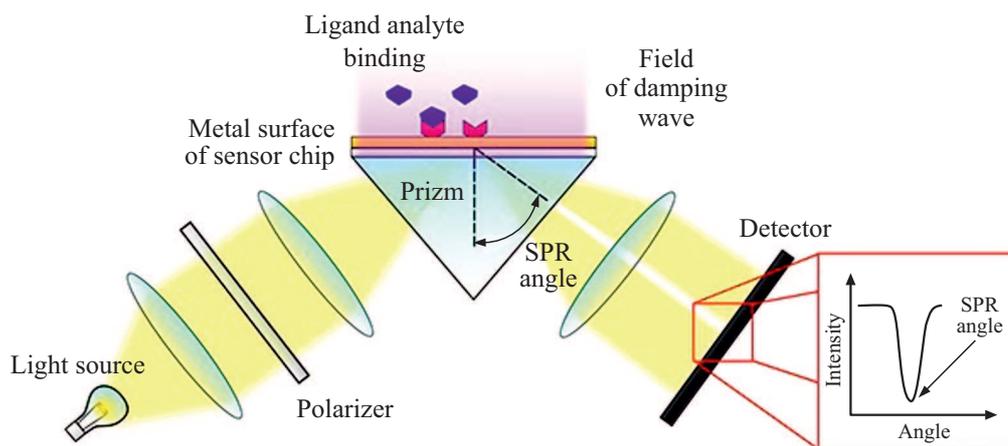


Рис. 3. Схематическое представление SPR-анализа. Регистрация массопереноса аналита между средой и зоной измерения осуществляется путем слежения за изменением резонансного угла [81].

метода связывания призмы Кречмана [86]. Тонкая пленка серебра и оксид графена (CO) были нанесены на поверхность призмы для возбуждения поверхностных плазмонов. Их толщины были в интервале от 43 до 49 nm и от 1 до 15 nm соответственно. Установлено, что оптимальная чувствительность может быть достигнута при использовании CO максимальной толщиной 1 nm.

Разработана портативная, мультиплексная, недорогая, микрожидкостная интегрированная SPR-платформа, позволяющая быстро выявлять и количественно определять *E. coli*, *S. aureus* [87]. Платформа осуществляет надежное улавливание и детекцию *E. coli* с концентрациями в диапазоне от $1 \cdot 10^5$ до $3.2 \cdot 10^7$ CFU/ml в PBS и жидкости для перитонеального диализа. Представленная разработка потенциально способна захватывать и определять другие патогены в пунктах оказания первичной помощи.

Рассмотрен новый избирательный и чувствительный метод выявления Грам(–)-бактерий, основанный на модифицированном полимиксинам В сенсорном чипе, при помощи лазерной сканирующей системы конфокальной визуализации с поверхностным плазмонным резонансом (LSCI-SPR) [88]. Молекула полимиксина В прочно взаимодействовала с клеточной мембраной бактерии. Проведенное сопоставление SPR-сигналов, которые изменялись в зависимости от концентрации окрашенных SYTO 9 бактерий, и флуоресцирующих изображений установило их соответствие. Результаты показали, что *E. coli* отчетливо дифференцировались с чувствительностью $1 \cdot 10^2$ CFU/ml.

Безметочный оптический иммуносенсор, основанный на SPR-методе, предложен для осуществления быстрой и избирательной детекции *B. milletensis* [89]. Иммуносенсор был сконструирован путем иммобилизации захватывающих антител на модифицированном 11-меркаптоундекановой кислотой золотом диске. Чувствительность выявления *B. milletensis* установлена в диапа-

зоне от $1 \cdot 10^3$ до $1 \cdot 10^7$ CFU/ml, а пороговое значение составило 100 CFU/ml.

Представлена разработка недорогого и простого для производства сенсора выявления бактерий, основанного на SPR с модулированной интенсивностью, при помощи монохроматического возбуждения в пластмассовом оптическом волокне (POF) [90]. U-образные датчики с 8 mm диаметром кривизны были изготовлены из полиметилметакрилатовых оптических волокон для SPR-измерений. Тонкие пленки золота толщиной 30, 50,70 и 100 nm были нанесены на область U-формы посредством RF (Radiofrequency) магнетронного распыления. Антитела к *E. coli* были иммобилизованы на золотой поверхности, расположенной поверх волокна. Чувствительность выявления *E. coli* составила $1 \cdot 10^4$ CFU/ml. Позже исследователям удалось достигнуть чувствительности метода $1.5 \cdot 10^3$ CFU/ml [91].

Зеленая флуоресценция белков

Современным подходом изучения микроорганизмов является использование генетических белковых красителей — зеленых флуоресцентных белков (green fluorescent protein, GFP). Выделенный из медузы *Aequorea victoria* белок испускает зеленый свет — флуоресцирует, возбуждаясь под действием синего или УФ излучения (рис. 4) [92]. В настоящее время ген GFP, клонированный в 1992 году Вардом, используется в качестве светящейся метки для изучения экспрессии клеточных белков.

Разработана коллекция штаммов, экспрессирующих белок GFP, что позволяет быстро проводить скрининг видов *E. coli* O157:H7, *Shigella sonnei*, *S. flexneri*, *S. enteric* subsp. *Enteric serovar gaminera*, *S. mbandaka*, *S. tennesse*, *S. sinnesota*, *S. senftenberg* и *S. typhimurium* на селективных и неселективных пластинах [93]. Флуоресценция штаммов происходит под воздействием УФ

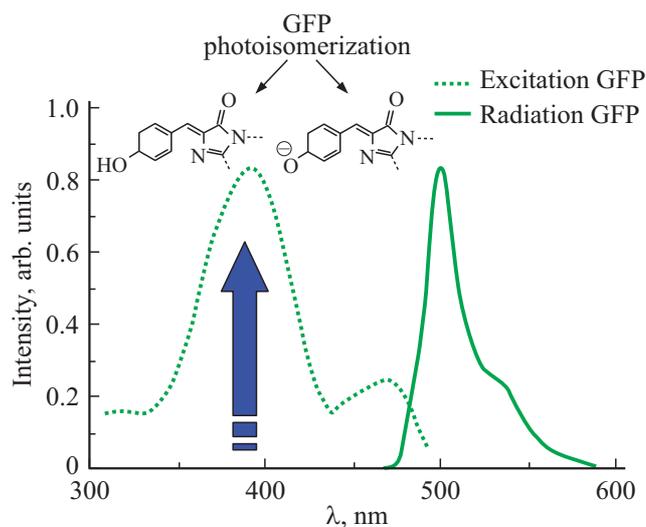


Рис. 4. Спектральные характеристики белка GFP. Максимумы возбуждения флуоресценции GFP 395 и 475 nm, максимум флуоресценции ~ 508 nm [92].

излучения с сохранением данного свойства в отсутствии антибиотика. Такие флуоресцирующие кишечные штаммы являются сложными в разработке и обеспечивают простое и эффективное средство определения перекрестной контаминации.

Посредством совместного использования методов флуоресцентного анализа и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) было установлено, что автофлуоресценция *E. coli* преимущественно возникает из выделяемых флавинов во внешних средах [94]. Определено, что флуоресценция секретированных флавинов может быть использована в качестве дополнительного метода измерения концентрации клеток.

Использование GFP в качестве репортера для белковой локализации в *E. coli* исследовано путем слияния генов между *malE* (кодирующий мальтоза-связывающий белок, МВР) и вариантом *gfp*, оптимизированном для флуоресценции в бактерии (GFPuv) [95]. Различие между флуоресцирующими и нефлуоресцирующими колониями использовалось в качестве селективной характеристики для выделения мутаций сигнальных последовательностей *malE*.

Сконструирован рекомбинантный штамм *Y. pestis*, продуцирующий белок GFP методом электропорации [96]. Полученный штамм содержит векторную плазмиду pTurboGFP-B, кодирующую синтез белка GFP, и является устойчивым к ампициллину. Исследование является перспективным для изучения возбудителя чумы с клетками простейших и млекопитающих.

Тераностика

Для расширения возможностей методов биомедицинской оптической визуализации, основанных на ис-

пользовании флуоресцентных белков, перспективной является разработка биосовместимых фотолуминесцентных (ФЛ) наноматериалов, обладающих уникальными физико-химическими и оптическими свойствами — фотостабильностью, „настраиваемыми“ узкими спектрами фотолуминесценции, устойчивостью к условиям окружающей среды. Наиболее значимой задачей представляется создание ФЛ наноконструкций, обладающих диагностическими и терапевтическими свойствами, необходимыми для решения задач тераностики. Термином „тераностика“, являющимся сочетанием слов „терапия“ и „диагностика“, обозначают новый медицинский подход, сочетающий в себе раннюю диагностику и терапию заболевания одновременно. В настоящее время тераностика является быстроразвивающейся областью биомедицинских исследований, направленной на выявление микроорганизмов патогенной микрофлоры с высокой чувствительностью, быстротой, надежностью постановки анализа и мониторингом распределения терапевтического агента в организме. Самое широкое распространение при создании соединений, необходимых для тераностики, получило использование наночастиц коллоидного золота, квантовых точек, люминесцентных нанодiamondов, нанодиффракционных решеток и др. [97,98]. Для осуществления целевого, контролируемого взаимодействия неорганических частиц с живыми биосистемами проводят реакцию биоконъюгации — присоединения к поверхности наночастиц биомолекул (антител, лигандов, лекарственных препаратов, нуклеиновых кислот и др.) [99].

Наночастицы золота и многофункциональные наноконструкты на их основе являются предметом исследований для биомедицинских приложений, а их свойства могут быть специально разработаны путем контролируемого изменения их размера, формы, структуры и функционализации поверхности [100]. Так, золотые наностержни и золото-серебряные наноклетки можно считать эффективными наноабсорберами, а наночастицы SiO₂/Au и золотые нанозвезды обладают как поглощающими свойствами, так и способностью к сверхбыстрой диффузии.

Золотые наночастицы различного размера и формы широко используются для плазмонной фототермической (Plasmonic photothermal (PPT))/фотодинамической (Photodynamic, PPD) терапии под воздействием лазерного излучения в ближней ИК области [101]. Так, инкубация бактерий *S. aureus* с наноконъюгатами и последующим облучением на длине волны 808 nm приводила к снижению жизнеспособности на 65–90%.

Изготовлены композитные наночастицы, состоящие из плазмонного ядра (золотые наностержни или золото-серебряные наноклетки) и функционализированной гематопорфирином кремниевой оболочки, для анализа фотодинамического и фототермического воздействия в отношении *S. aureus* 209 P [102]. В результате наблюдалась усиленная инактивация бактерий с использованием наноконструктов по сравнению с референсными растворами (гематопорфирина или покрытых

кремнеземом плазмонных наночастиц), что объясняется их селективным накоплением вблизи бактерий.

Изучено влияние ИК лазерного излучения на длине волны 805-808 nm на бактерии штамма *S. aureus* 209 P, инкубированные в растворах индоцианинового зеленого, а также коллоидных золотых наночастиц, наноклеток и их конъюгатов с индоцианиновым зеленым [103]. В результате исследований было установлено, что клетки бактерий одинаково подвержены действию ИК лазерного излучения после предварительной сенсбилизации индоцианиновым зеленым, наночастицами золота отдельно и конъюгатами наночастиц с индоцианиновым зеленым. Таким образом, является возможным применение комплексов индоцианинового зеленого с наночастицами золота для фототерапии инфекционных заболеваний, вызванных антибиотикорезистентными штаммами.

Золотые нанокластеры стали предметом интенсивного изучения в связи с их растущим применением в области визуализации, детектирования и наномедицины. Синтезированы золотые нанокластеры, стабилизированные молекулами бычьего сывороточного альбумина (Bovine serum albumin, BSA) для последующей конъюгации с иммуноглобулином человека антистафилококковым (antiSAIG) и фотодинамическим препаратом Фотосенс® (Photosens®) (PS) для создания комплексов Au-BSA-antiSAIG-PS [104]. Полученные наноконструкции позволили проводить биоспецифическую детекцию *S. aureus* с высоким выходом (~ 14%) флуоресценции в красной области и высокой фотостабильностью, осуществлять инактивацию микроорганизмов.

Представлен тераностический метод, основанный на использовании агрегированных золотых наночастиц на поверхности бактерий *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecium* и *B. subtilis* посредством специфического воздействия ванкомицина и реакции биортогонального циклоприсоединения, перспективный для лечения бактериальных инфекций [105]. Установлен опыт применения квантовых точек для успешного мечения и инактивации бактерий штаммов Salmonella DT 104 и MRSA, выделенных из клинических образцов [106]. Проведенные исследования показали, что алмазные наночастицы сочетают в себе свойства высокой биосовместимости, в то же время подавляя жизнеспособность и рост бактерий. В результате изучения взаимодействия наноалмазов с Грам(+) штаммами *S. aureus* ATCC 12600 и Грам(-) *E. coli* ATCC 8739 было определено резкое снижение скорости роста бактерий стафилококка, что не наблюдалось в случае кишечной палочки [107].

Таким образом, в представленном обзоре был рассмотрен опыт успешного использования методов ИК, КР-спектроскопии, оптических биосенсоров на эффекте поверхностно-плазмонного резонанса для идентификации бактерий, их достоинства и недостатки. Каждый класс методов использует специфические особенности структуры бактерий.

ИК спектроскопия обладает способностью идентификации бактерий на основе модели их молекулярных ко-

лебаний. Несмотря на то, что FTIR-спектроскопия имеет ряд преимуществ, включая быстрое получение спектров, чувствительность, которая может быть улучшена путем усреднения спектров многочисленными сканированиями, неинвазивной детекцией, она имеет главный недостаток, заключающийся в том, что вода вызывает сильное фоновое поглощение. Таким образом, биологические образцы, в том числе содержащие бактерии, должны быть высушены перед проведением ИК измерений. Тем не менее ИК спектроскопия эффективно используется в исследовании строения биологических объектов и непосредственно живых клеток.

Традиционная КРС и ее производные являются значимым методом в области обнаружения бактерий. КРС позволяет получать характерные молекулярные характеристики, является нечувствительной к воде, что дает возможность проводить выявление биологических образцов в их нативной среде, а также неинвазивной. Однако традиционная КРС генерирует слабый сигнал, поэтому с целью с целью повышения чувствительности анализа была разработана КРС методом SERS. Данный метод проявляет большую универсальность, хорошую чувствительность и специфичность и является наиболее широко используемой техникой для идентификации бактерий.

Самым современным техническим приемом для оптического бактериального обнаружения является использование SPR-биосенсоров, что стало возможным благодаря достижениям в области нанотехнологий. Этот способ определения, который регистрирует изменения в функции локального диэлектрического отклика, является чрезвычайно чувствительным к материалу, размеру, форме, толщине и расстоянию между частицами поверхности датчика, а также показателю преломления окружающей среды. Основной проблемой использования SPR-спектроскопии для определения бактерий является сходство показателей преломления сред и аналитов цели, таких как биомолекул, бактерий. Это ограничение может быть устранено путем добавления усиливающего сигнала агента, такого как комплекс ДНК с золотыми наночастицами. Традиционное использование диффузии для управления перемещения масс к поверхности ограничивает скорость проведения анализа. Данная проблема может быть решена использованием активного транспорта, например диэлектрофореза со встречно-шттыревыми решетками электродов. Подобно всем подходам на основе поверхностного поглощения, возможность неспецифической адсорбции дает ложные положительные сигналы и является самой распространенной проблемой, которая обычно решается путем отделения неактивных частей поверхности неспецифическим адсорбционно-резистентным покрытием, таким как полиэтиленгликоль.

Флуоресцентные белки стали важнейшим инструментом исследования в области молекулярной биологии для оценки эффективности применения молекулярных и клеточных технологий лечения. Преимуществами использования таких белков является их устойчивость к

протеазам, изменению pH, что позволяет ему длительное время накапливаться и храниться внутри клетки. Недостатком GFP является флуоресценция в зеленой области, где некоторые клетки обладают аутофлуоресценцией, скрывающей полезный сигнал. С помощью методов геной инженерии были получены белки, флуоресцирующие в различных спектральных областях — от синей до красной.

Значительный прорыв в нанотехнологиях связан также с разработкой целого ряда материалов нового вида, представляющих частицы различной природы размером 1–200 nm, обладающих уникальными физико-химическими характеристиками, что способствовало развитию тераностики. Разработанные на их основе тераностические агенты одновременно осуществляют направленную доставку к молекулярной мишени, визуализацию очага заболевания и его изменение в процессе лечения, а также эффективное и селективное воздействие на молекулу-мишень.

Заключение

В итоге можно сделать вывод, что оптические технологии для изучения и идентификации микроорганизмов хорошо зарекомендовали себя на практике и являются перспективными для дальнейших исследований. ИК фурье-спектроскопия позволяет идентифицировать и с высокой точностью проводить количественное определение биомолекул, таких как белки, липиды, углеводороды, а также ДНК/РНК. ИК анализ высушенной взвеси бактерий позволяет дифференцировать микроорганизмы до уровня штамма. По аналогии с ИК фурье-спектроскопией КР-спектроскопия весьма избирательна, что позволяет дифференцировать схожие по строению биохимические молекулы.

Важной задачей является расширение баз данных КР-спектров, учитывающих фенотипические вариации физиологических состояний бактерий. Технология SPR-биосенсоров является универсальной и одним из основных подходов исследования межмолекулярных взаимодействий широкого диапазона концентраций, позволяя проводить высокоточную и высокочувствительную детекцию, что находит применение как в фундаментальных, так и прикладных исследованиях.

В последние годы для выявления микроорганизмов широко используются методы молекулярной визуализации с применением инертных контрастных макромолекул, не влияющих на процессы жизнедеятельности клетки. Такими удобными и эффективными маркерами микроорганизмов представляются различные ФЛ белки, к которым относится белок GFP. Использование ФЛ белков позволило визуализировать процессы, происходящие при развитии инфекционных процессов в микроорганизме, проводить оценку выживаемости микроорганизмов во внешней среде.

Важнейшим направлением современных исследований является развитие фундаментальных принципов получения многофункциональных композитных наноматериалов для биомедицинской тераностики, комбинирующих диагностические и терапевтические свойства в одной наноструктуре. Определяются возможности применения комбинированной фототермической и фотодинамической терапии на клеточных моделях (патогенные микроорганизмы и раковые клетки) и в модельных экспериментах на лабораторных животных с привитыми или спонтанными опухолями.

Конфликт интересов

Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Список литературы

- [1] *Тринеева О.В., Рудая М.А., Гудкова А.А., Сливкин А.И.* // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2018. № 4.С. 187–194.
- [2] *Mitsutake H., Poppi R.J., Breikreitz M.C.* // J. Braz. Chem. Soc. 2019. V. 30. N 11. P. 2244–2258. doi 10.21577/0103-5053.20190116.
- [3] *Ho A.H.P., Wu S.Y., Kong S.K., Zeng S., Yong K.T.* // Handbook of Photonics for Biomedical Engineering. 2017. P. 123–145. doi 10.1007/978-94-007-5052-4_38.
- [4] *Quinteiro Rodriguez M.P.* // Clinical Microbiology Newsletter.2000. V. 22. N 8. P. 57–61. doi10.1016/S0196-4399(00)88850-9.
- [5] *Rundle H.N.* // J. Res. Nat. Bur. Std. C. 1965. V. 69. N 1. P. 5–11.
- [6] *Greensteet J.E.S., Norris K.P.* // Spectrochim. Acta. 1957. V. 9. N 3. P. 177–198. doi 10.1016/0371-1951(57)80131-3.
- [7] *Goulden J.D.S., Sharpe M.E.* // J. Gen.Microbiol. 1958. V. 19. N 1. P. 76–86. doi 10.1099/00221287-19-1-76.
- [8] *Jackson M., Mantsch H.* // Infrared Spectroscopy of Biomolecules. / Ed. by Mantsch H.H. and Chapman D. N.Y.: Wiley-Liss., 1996. P. 311–340.
- [9] *Riddle J.W., Kabler P.W., Kenner B.A., Bordner R.H., Rockwood S.W., Stevenson H.J.R.* // J. Bacteriol. 1956. V. 72. N 5. P. 593–603.
- [10] *Maquelin K., Kirschner C., Choo-Smith L.-P., Van den Braak N., Endtz H.Ph., Naumann D., Puppels G.J.* // J. Microbiol. Methods. 2002. V. 51. P. 255–271. doi 10.1016/S0167-7012(02)00127-6
- [11] *Naumann D., Fijala V., Labischinski H., Giesbrecht P.* // J. Mol. Struct. 1988. V. 174. P. 165–170. doi10.1016/0022-2860(88)80152-2
- [12] *Gomez M.A., Perez M.A.B., Gil F.J.M., Diez A.D., Rodriguez J.F.M., Rodriguez P.G., Domingo A.O., Torres A.R.* // J. Microbiol. Methods. 2003. V. 55. P. 121–131. doi 10.1016/S0167-012(03)00120-9
- [13] *Kanki P., Grimes D.J.* Infectious Diseases: Selected Entries from the Encyclopedia of Sustainability Science and Technology. 2012. 506 p.

- [14] *Lipkus A.H., Chittur K.K., Vesper S.J., Robinson J.B., Pierce G.E.* // J. Ind. Microbiol. 1990. V. 6. N 1. P. 71–75. doi 10.1007/bf01576179
- [15] *Curk M.C., Peledan F., Hubert J.C.* // FEMS Microbiol. Lett. 1994. V. 123. N 3. P. 241–248. doi 10.1111/j.1574-6968.1994.tb07231.x
- [16] *Siebert F.* // Methods in Enzymology. 1995. V. 246. P. 501–526. doi 10.1016/0076-6879(95)46022-5
- [17] *Jackson M., Sowa M.G., Mantsch H.H.* // Biophys. Chem. 1997. V. 68. N 1–3. P. 109–125. doi 10.1016/s0301-4622(97)80555-8
- [18] *Diem M., Boydston-White S., Chiriboga L.* // Appl. Spectrosc. 1999. V. 53. N 4. P. 148–161. doi 10.1366/0003702991946712
- [19] *Wenning M., Seiler H., Scherer S.* // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V. 68. N 10. P. 4717–4721. doi 10.1128/AEM.68.10.4717-4721.2002
- [20] *Ausili A., Sanchez M., Gomez-Fernandez J.C.* // Biomedical Spectroscopy and Imaging. 2015. V. 4. N 2. P. 159–170. doi 10.3233/BSI-150104
- [21] *Hu J., Boch P.W.* // J. Anal. Test. 2017. V. 1. N 1. P. 1–29. doi 10.1007/s41664-017-0002-z
- [22] *Lasch P., Stammler M., Zhang M., Baranska M., Bosch A., Majzner K.* // Anal. Chem. 2018. V. 90. N 15. doi 10.1021/acs.analchem.8b01024
- [23] *Duygu D., Baykal T., Acikgoz, Yildiz K.* // G.U.J. Sci. 2009. V. 22. N 3. P. 117–121.
- [24] *Sousa C., Silva L., Grosso F., Nemeç A., Lopes J., Peixe L.* // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2014. V.33. N 8. P. 1345–1353. doi 10.1007/s10096-014-2078-y
- [25] *Bosch A., Minan A., Vescina C., Degrossi J., Gatti B., Montanaro P., Messina M., Franco M., Vay C., Schmitt J., Naumann D., Yantorno O.* // J. Clin. Microbiol. 2008. V. 46. N 8. P. 2535–2546. doi 10.1128/JCM.02267-07
- [26] *Kuhm A.E., Suter D., Felleisen R., Rau J.* // Appl. Environ. Microbiol. 2009. V. 75. N 18. P. 5809–5813. doi 10.1128/AEM.00206-09
- [27] *San-Blas E., Cubillan N., Guerra M., Portillo E., Esteves I.* // Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc. 2012. V. 93. P. 58–62. doi 10.1016/j.saa.2012.03.006
- [28] *Dawson S.E., Gibreel T., Nicolaou N., AlRabiah H., Xu Y., Goodacre R., Upton M.* // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2014. V. 33. № 6. P. 983–988. doi 10.1007/s10096-013-2036-0
- [29] *Sousa C., Silva L., Grosso F., Lopes J., Peixe L.* // J. Photochem. Photobiol. B. 2014. V. 133. N 5. P. 108–114. doi 10.1016/j.jphotobiol.2014.02.015
- [30] *Martak D., Valot B., Sauget M., Cholley P., Thouverez M., Bertrand X., Hocquet D.* // Front. Microbiol. 2019. V. 10. P. 1–9. doi 10.3389/fmicb.2019.01440
- [31] *Vogt S., Löffler K., Dinkelacker A.G., Bader B., Autenrieth I.B., Peter S., Liese J.* // Front. Microbiol. 2019. V. 10. P. 1–11. doi 10.3389/fmicb.2019.02582
- [32] *Zarnowiec P., Mizera A., Chrapek M., Urbaniak M., Kaca W.* // Innate Immunity. 2016. V. 22. N 5. P. 325–335. doi 10.1177/1753425916647470
- [33] *Boudaud N., Coton M., Coton E., Pineau S., Travert J., Amiel C.* // J. Appl. Microbiol. 2010. V. 109. N 1. P. 166–179. doi 10.1111/j.1365-2672.2009.04643.x
- [34] *Lefier D., Hirst D., Holt C., Williams A.G.* // FEMS Microbiology Lett. 1997. V. 147. N 1. P. 45–50. Doi 10.1111/j.1574-6968.1997.tb10218.x
- [35] *Rebuffo C.A., Schmitt J., Wenning M., von Stetten F., Scherer S.* // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. N 2. P. 994–1000. Doi 10.1128/AEM.72.2.994-1000.2006
- [36] *Rebuffo-Scheer C.A., Schmitt J., Scherer S.* // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. N 3. P. 1036–1040. Doi 10.1128/AEM.02004-06
- [37] *Lin S.F., Schraft H., Griffiths M.W.* // J. Food. Prot. 1998. V. 61. N 7. P. 921–923. doi 10.4315/0362-028X-61.7.921
- [38] *Beattie S.H., Holt C., Hirst D., Williams A.G.* // FEMS Microbiol. Lett. 1998. V. 164. N 1. P. 201–206. Doi 10.1111/j.1574-6968.1998.tb13086.x
- [39] *Branquinho R., Sousa C., Osorio H., Meirinhos-Soares L., Lopes J., Carrico J.A., Busse H.J., Abdulmawjood A., Klein G., Kampfer P., Pintado M.E., Peixe L.V.* // Int. J. Syst. Evol. Micr. 2014. V. 64. P. 3867–3876. doi10.1099/ijs.0.067850-0
- [40] *Рой А.А., Курдюш И.К., Остаюк С.Н., Савельев Ю.В.* // Микробиол. журн. 2017. Т. 19. № 4. С. 12–20.
- [41] *Tareb R., Bernardeau M., Amiel C., Vernoux J.P.* // FEMS Microbiology Letters. 2017. V. 364. N 2. P. 1–8. doi 10.1093/femsle/fnw298
- [42] *Helm D., Labischinski H., Shallechn G., Naumann D.* // J. Gen. Microbiol. 1991. V. 137. N 1. P. 69–79. Doi 10.1099/00221287-137-1-69
- [43] *Schabauer L., Wenning M., Huber I., Ehling-Schulz M.* // BMC Vet. Res. 2014. V. 10. N 1. P. 1–11. Doi 10.1186/1746-6148-10-156
- [44] *Gurbanov R., Yildiz F.* // J. Food Health Sci. 2017. V. 3. N 3. P. 117–131. doi 10.3153/JFHS17015
- [45] *Vaz M., Meirinhos-Soares L., Sousa C.C., Ramirez M., Melo-Cristino J., Lopes J.A.* // J. Microbiol. Methods. 2013. V. 93. N 2. P. 102–107. doi 10.1016/j.mimet.2013.02.008
- [46] *Grunert T., Wenning M., Sol Barbagelata M., Fricker M., Sordelli D.O., Buzzola F.R., Ehling-Schulz M.* // J. Clin. Microbiol. 2013. V. 51. N 7. P. 2261–2266. doi 10.1128/JCM.00581-13
- [47] *Kirschner C., Maquelin K., Pina P., Ngo T.N.A., Choo-Smith L.P., Sockalingum G.D., Sandt C., Ami D., Orsini F., Doglia S.M., Allouch P., Mainfait M., Puppels G.J., Naumann D.* // J. Clin. Microbiol. 2001. V. 39. N 5. P. 1763–1770. doi 10.1128/JCM.39.5.1763-1770.2001
- [48] *Lamprell H., Mazerolles G., Kodjo A., Chamba J.F., Noel Y., Beuvier E.* // Int. J. Food. Microbiol. 2006. V. 108. N 1. P. 125–129. doi 10.1016/j.jfoodmicro.2005.10.015
- [49] *Levasseur-Garcia C., Couderc C., Tormo H.* // J. Near Infrared Spectroscopy. 2017. V. 25. N 4. P. 231–241. doi 10.1177/0967033517719383
- [50] *Плешакова Е.В.* // Поволжский экологический журнал. 2010. № 4. С. 374–382.
- [51] *Nagib S., Rau J., Samra O., Lammler C., Schlez K., Zschock M., Prenger-Berninghoff E., Klein G., Abdulmawjood A.* // PLoS ONE. 2014. V. 9. N 8. P. 1–5. Doi 10.1371/journal.pone.0104654
- [52] *Sandt C., Madoulet C., Kohler A., Allouch P., De Champs C., Manfait M., Sockalingum G.D.* // J. Appl. Microbiol. 2006. V. 101. N 4. P. 785–797. Doi 10.1111/j.1365-2672.2006.02969.x
- [53] *Yu C., Irudayaraj J.* // Biopolymers. 2005. V. 77. N 6. P. 368–377. Doi 10.1002/bip.20247
- [54] *Al-Holy M.A., Lin M., Alhaj O.A., Abu-Goush M.H.* // J. Food Sci. 2015. V. 80. N 2. P. 1–6. doi 10.1111/1750-3841.12768

- [55] Whittaker P., Mossoba M.M., Al-Khaldi S., Fry F.S., Dunkel V.C., Tall B.D., Yurawecz M.P. // J. Microbiol. Methods. 2003. V. 55. N 3. P. 709–716. doi 10.1016/j.mimet.2003.07.005
- [56] Lee J., Ahn M.S., Lee Y.L., Jie E.Y., Kim S.G., Kim S.W. // J. Appl. Microbiol. 2019. V. 126. N 3. P. 864–871. doi 10.1111/jam.14171
- [57] Fanaei M., Emtiazi G. // Progress in Biological Sciences. 2017. V. 7. N 1. P. 1–9. Doi 10.22059/PBS.2018.206895.1217
- [58] Singh R.C.V. // 2002. Phys. Perspect. V. 4. P. 399–420. doi 10.1007/s000160200002
- [59] Rostron P., Gaber S., Gaber D. // Intern. J. Engineering and Technical Research (IJETR). 2016. V. 6. N 1. P. 50–64.
- [60] Хлебцов Н.Г., Дыкман Л.А., Хлебцов Б.Н., Ханадеев В.А., Панфилова Е.В. // Вестник РФФИ. 2014. В. 84. № 4. С. 18–33.
- [61] Андрюков Б.Г., Карпенко А.А., Матосова Е.В., Ляпун И.Н. // Журнал СТМ. 2019. Т. 11. № 4. С. 161–174. doi 10.17691/stm2019.11.4.19
- [62] Кукушкин В.И., Гришина Я.В., Егоров С.В., Соловьев В.В., Кукушкин И.В. // Письма в ЖЭТФ. 2016. Т. 103. Вып. 8. С. 572–577. doi 10.7868/S0370274X16080038
- [63] Yang D., Zhou H., Dina N.E., Haisch C. // R. Soc. open sci. 2018. V. 5. N 9. P. 1–11. doi 10.1098/rsos.180955
- [64] Замалева А.И., Кахраман М., Чулха М., Фахруллин Р.Ф. // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Физ.-матем. науки. 2009. Т. 151. Кн. 1. С. 82–89.
- [65] Li R., Dhankar D., Chen J., Krishnamoorthy A., Cesario T.C., Rentzepis P.M. // IEEE. Access. 2019. V. 7. P. 23549–23559. doi 10.1109/ACCESS.2019.2899006
- [66] Novelli-Rousseau A., Espagnon I., Filiputti D., Gal O., Douet A., Mallard F., Josso Q. // Scientific reports. 2018. V. 8. N 1. P. 14–12. doi 10.1038/s41598-018-22392-9
- [67] DeJong C.S., Wang D.I., Polyakov A., Rogacs A., Simske S.J., Shkolnikov V. // ChemRxiv. Preprint. 2017. V. 2. N 27. P. 8431–8435. doi 10.1002/slct.201701669
- [68] Colnita A., Dina N.E., Leopold N., Vodnar D.C., Bogdan D., Porav S.A., David L. // Nanomaterials. 2017. V. 7. N 9. P. 1–16. doi 10.3390/nano7090248
- [69] Ren Y., Ji Y., Teng L., Zhang H. // Microb. Cell Fact. 2017. V. 16. N 1. P. 14–10. Doi 10.1186/s12934-017-0849-8
- [70] Akanny E., Bonhomme A., Commun C., Doleans-Jordheim A., Farre C., Bessueille F., Bourgeois S., Bordes C. // J. Raman. Spectrosc. 2020. V. 51. N 4. P. 619–629. doi 10.1002/jrs.5827
- [71] Александров М.Т., Маргарян Э.Г. // Стоматология. 2018. № 1. С. 27–32. doi 10.17116/stomat201897127-32
- [72] Munchberg U., Rosch P., Bauer M., Popp J. // Anal. Bioanal. Chem. 2014. V. 406. N 13. P. 3041–3050. doi 10.1007/s00216-014-7747-2
- [73] Lussier F., Thibault V., Charron B., Wallace G.Q., Masson J.F. // TrAC Trends in Anal. Chem. 2020. V. 124. doi 10.1016/j.trac.2019.115796
- [74] Qu K., Guo F., Liu X., Lin Y., Zou Q. // Front. Microbiol. 2019. V. 10. N 827. P. 1–10. doi 10.3389/fmicb.2019.00827
- [75] Ho C.S., Jean N., Hogan C.A., Blackmon L., Jeffrey S.S., Holodny M., Banaei N., Saleh A.A.E., Ermon S., Dionne J. // Nat. Commun. 2019. V. 10. N 1. doi 10.1038/s41467-019-12898-9
- [76] Wood R.W. // Philos. Mag. Ser. 6. 1902. V. 4. N 21. P. 396–402. doi 10.1080/14786440209462857
- [77] Otto A. // Z. Physik. 1968. V. 216. P. 398–410. doi 10.1007/BF01391532
- [78] Kretschmann E., Raether H. // Zeitschrift für Naturforschung. Section A. Physical Sciences. 1968. V. 23. N 12. P. 2135–2136. Doi 10.1515/zna-1968-1247
- [79] Liedberg B., Nylander C., Lundstrom I. // Sensors and Actuators. 1983. V. 4. P. 299–304. doi 10.1016/0250-6874(83)85036-7
- [80] Сотников Д.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. // Успехи биологической химии. 2015. Т. 55. С. 391–420.
- [81] [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.xantec.com/technotes/optics.php>
- [82] Eser E., Ekiz O.O., Celik H., Sulek S., Dana A., Ekiz H.O. // Int. J. Biosci. Biochem. Bioinform. 2015. V. 5. N 6. P. 329–335. doi 10.17706/ijbbb.2015.5.6.329-335
- [83] Masdor N.A., Altintas Z., Tothill I.E. // Chemosensors. 2017. V. 5. N 2. doi 10.3390/chemosensors5020016
- [84] Nguyen H.H., Yi S.Y., Woubit A., Kim M. // Appl. Sci. Converg. Technol. 2016. V. 25. N 3. P. 61–65. doi 10.5757/ASCT.2016.25.3.61
- [85] Lukose J., Shetty V., Ballal M., Chidangil S., Sinha R.K. // Laser Physics Letters. 2018. V. 15. N 7. doi 10.1088/1612-202X/aabed8
- [86] Mukhtar W.M. // AIP Conference Proceedings. 2020. V. 2203. N 1. doi 10.1063/1.5142094
- [87] Tokel O., Yildiz U.H., Inci F., Durmus N.G., Ekiz O.O., Turker B., Cetin C., Rao S., Sridhar K., Natarajan N., Shafiee H., Dana A., Demirci U. // Scientific Reports. 2015. V. 5. № 1. doi 10.1038/srep09152
- [88] Li Y., Zhu L., Zhang H., Liu W., Ge J., Wu J., Wang P. // Sens. And Act. B: Chemical. 2018. V. 259. N 15. P. 492–497. Doi 10.1016/j.snb.2017.12.042
- [89] Saberi F., Kamali M., Taheri R.A., Ramandi M.F., Bagdeli S., Mirnejad R. // J. Braz. Chem. Soc. 2016. V. 27. N 11. P. 1960–1965. Doi 10.5935/0103-5053.20160085
- [90] Arcas A.S., Dutra F.S., Allil R.C.S.B., Werneck M.M. // Biotech, Biomaterials and Biomedical: TechConnect Briefs. 2017. V. 3. P. 231–234.
- [91] Arcas A.S., Dutra F.S., Allil R.C.S.B., Werneck M.M. // Sensors (Basel). 2018. V. 18. N 2. Doi 10.3390/s18020648
- [92] [Электронный ресурс] Режим доступа: https://studbooks.net/1820790/matematika_himiya_fizika/zelenyy_fluorestsiruyuschiy_belok
- [93] Binet R., Pettengill E.A., Hoffmann M., Hammack T.S., Monday S.R. // Food Microbiol. 2018. V. 76. P. 553–563. doi 10.1016/j.fm.2017.10.014
- [94] Mihalcescu I., Gateau M.V.M., Chelli B., Pinel C., Ravanat J.L. // Physical Biology, Institute of Physics: Hybrid Open Access. 2015. V. 12. N 6. doi 10.1088/1478-3975/12/6/066016
- [95] Feilmeier D.J., Iseminger G., Schroeder D., Webber H., Phillips G.J. // J. Bacteriol. 2000. V. 182. N 14. P. 4068–4076. doi 10.1128/jb.182.14.4068-4076.2000
- [96] Куклева Л.М., Тучков И.В., Оглодин Е.Г., Девдариани З.Л., Морозов О.А., Кузнецов О.С., Германчук Е.Г., Ерошенко Г.А. // Проблемы особо опасных инфекций. 2019. № 4. С. 61–66. doi 10.21055/0370-1069-2019-4-61-66
- [97] Деев С.М., Лебедево Е.Н. // Биоорганическая химия. 2015. Т. 41. № 5. С. 539–552. doi 10.7868/S013234231505005X.

- [98] Mei L., Zhu S., Yin W., Chen C., Nie G., Gu Z., Zhao Y. // *Theranostics*. 2020. V. 10. N 2. P. 757–781. doi 10.7150/thno.39701
- [99] Zavaleta C., Ho D., Chung E.J. // *SLAS Technol.* 2018. V. 23. N 3. P. 281–293. doi 10.1177/2472630317738699
- [100] Khlebtsov N., Bogatyrev V., Dykman L., Khlebtsov B., Staroverov S., Shirokov A., Matora L., Khanadeev V., Pylaev T., Tsyganova N., Terentyuk G. // *Theranostics*. 2013. V. 3. N 3. P. 167–180. doi 10.7150/thno.5716
- [101] Bucharskaya A., Maslyakova G., Terentyuk G., Yakunin A., Avetisyan Y., Bibikova O., Tuchina E., Khlebtsov B., Khlebtsov N., Tuchin V. // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. V. 17. N 8. P. 1–26. doi 10.3390/ijms17081295
- [102] Khlebtsov B.N., Tuchina E.S., Khanadeev V.A., Panfilova E.V., Petrov P.O., Tuchin V.V., Khlebtsov N.G. // *J. Biophotonics*. 2013. V. 6. N 4. P. 338–351. doi 10.1002/jbio.201200079
- [103] Тучина Е.С., Тучин В.В., Хлебцов Б.Н., Хлебцов Н.Г. // *Квантовая электроника*. 2011. Т. 41. № 4. С. 354–359.
- [104] Khlebtsov B., Tuchina E., Tuchin V., Khlebtsov N. // *RSC Advances*. 2015. V. 5. P. 61639–61649. doi 10.1039/C5RA11713E
- [105] Wang H., Ouyang W., Zhang X., Xue J., Lou X., Fan R., Zhao X., Shan L., Jiang T. // *J. Mater. Chem. B*. 2019. V. 7. P. 4630–4637. doi 10.1039/C9TB00845D
- [106] Lin F., Bao Y.W., Wu F.G. // *C*. 2019. V. 5. N 33. P. 1–21. doi 10.3390/c5020033
- [107] Ong S.Y., van Harmelen R.J.J., Norouzi N., Offens F., Venema I.M., Najafi M.B.H., Schirhagl R. // *Nanoscale*. 2018. V. 10. P. 17117–17124. doi 10.1039/C8NR05183F