20

Сравнительное исследование свежей и лиофилизированной биомассы бактерии *Enterobacter cloacae* K-7 методами колебательной спектроскопии

© А.А. Камнев [1], Ю.А. Дятлова [1], С.А. Климин [2], А.В. Тугарова [1]

[1] Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, Саратовский научный центр РАН, Саратов, Россия
[2] Институт спектроскопии РАН, Москва, Троицк, Россия

e-mail: a.a.kamnev@mail.ru

Поступила в редакцию 22.11.2025 г.
В окончательной редакции 06.12.2025 г.
Принята к публикации 06.12.2025 г.

Проведен сравнительный анализ спектров комбинационного рассеяния света (КРС) образцов свежей (отделенной центрифугированием и отмытой от культуральной среды; без высушивания) и лиофилизированной биомассы планктонной культуры бактерии *Enterobacter cloacae* K-7, а также инфракрасного (ИК) спектра последней (в режиме пропускания). Показано, что для свежей биомассы наличие значительного количества воды в образце в случае спектров КРС не приводит к маскировке или сдвигу основных полос функциональных групп биомакромолекул, характерных для бактерий, в сравнении с лиофилизированными клетками *E. cloacae*. Для последних как в спектрах КРС, так и в ИК-спектрах также присутствуют типичные для бактерий полосы колебаний основных функциональных групп. Полученные результаты указывают на возможность использования обоих способов пробоподготовки бактериальных биомасс для общего сравнительного анализа их биомакромолекулярного состава методом спектроскопии КРС, а также в случае лиофилизированной биомассы методом ИК-спектроскопии.

Ключевые слова: биомасса бактерий, спектроскопия комбинационного рассеяния света, инфракрасная спектроскопия, лиофилизация, *Enterobacter cloacae*.

DOI: 10.61011/OS.2026.01.62619.8802-25

Введение

Методы колебательной спектроскопии (в первую очередь инфракрасная (ИК) спектроскопия и спектроскопия комбинационного рассеяния света (КРС)) в последние десятилетия показывают устойчивый рост их использования в различных областях микробиологии [1–4], в том числе совместного — благодаря взаимодополняемости получаемых данных [5–8]. Это в значительной степени обусловлено относительной простотой пробоподготовки и измерений при возможности получения информации об общем биомакромолекулярном составе образцов на уровне молекулярных функциональных групп (по полосам колебаний групп атомов). Тем не менее обратной стороной такой простоты применения указанных методов является требование строгого соблюдения основных методологических правил для получения информативных спектров, отражающих реальное состояние исследуемых микробиологических объектов. Богатая информация, содержащаяся в колебательных спектрах, во многих случаях является также причиной сложности их интерпретации. Ввиду этого методологические работы, посвященные указанным методам, до сих пор актуальны (например, [9–13]).

В настоящей работе проведен сравнительный анализ спектров КРС образцов свежей биомассы (отделенной центрифугированием и отмытой от культуральной среды; без высушивания) и полученной из нее лиофилизированной биомассы планктонной культуры бактерии *Enterobacter cloacae* K-7, а также ИК фурье-спектров последней. Интерес к данному объекту исследования вызван тем, что многие бактерии рода *Enterobacter* являются фитостимулирующими для высших растений [14–16], обладают другими полезными в агробиотехнологическом отношении свойствами и используются в составе биоудобрений [17]. Помимо этого, сам вид *E. cloacae* обладает рядом дополнительных положительных свойств [14,18–20]. Лиофилизация (замораживание биомассы клеток с последующим высушиванием в вакууме) является одним из основных промышленных и лабораторных способов приготовления сухих микробных препаратов с целью их длительного хранения [21,22]. Важно отметить, что при этом значительная часть клеток остается жизнеспособной, переходя в дормантное (метаболически неактивное) состояние, что широко используется в различных областях микробной биотехнологии [22–24]. Заметим, что для почвенных бактерий также характерны циклические процессы высушивания с повторным увлажнением в природной среде с сохранением жизнеспособности [25]. Для практического применения сухих бактериальных препаратов, в частности в составе биоудобрений, важным параметром является

их сохранность и эффективность при хранении, чему уделяется особое внимание [26,27].

Материалы и методы исследования

Приготовление культуры бактерий

Культура *E. cloacae* K-7 получена из Коллекции ризосферных микроорганизмов, поддерживаемой в ИБФРМ РАН, Саратов, Россия (обращение от 20.11.2025; https://collection.ibppm.ru/collection/enterobacter/enterobacter-cloacae/); штамм выделен из ризопланы топинамбура (*Helianthus tuberosus* L.) [20]. Прекультура выращивалась в стандартных условиях, после чего культуру наращивали до конца логарифмической фазы роста (18 h) на той же солевой малатной среде, как указано ранее [13], отделяли центрифугированием, дважды отмывали физиологическим раствором (0.85% NaCl); часть культуры высушивали лиофилизацией.

Измерение спектров КРС

Для получения спектров КРС свежей биомассы использовали ее препарат после центрифугирования и отмывания (без высушивания); препарат хранили в холодильнике перед измерениями не более суток; перед началом измерений образец, помещенный в держатель (см. ниже), выдерживали при комнатной температуре в течение получаса. Лиофилизированную биомассу для получения спектров КРС смешивали с KBr (реактив для спектрального анализа) в соотношении 30 mg биомассы +70 mg KBr (для исключения разложения образца в луче лазера), перетирали 5 min в агатовой ступке до однородности и переносили в держатель образца — стеклянную пробирку (внутренний диаметр 3 mm, толщина стенок 1.5 mm). Измерения проводили, как описано ранее [28], с использованием фурье-спектрометра RFS-100 (Bruker, США; лазер с длиной волны возбуждения 1064 nm, мощность на образце ~ 0.1 W, время накопления спектра ~ 3 h, разрешение 2 cm^{-1}; управление прибором и коррекцию базовой линии спектров осуществляли с помощью программы OPUS Spectroscopy Software (США), поставляемой вместе со спектрометром).

Измерение ИК-спектров

Для измерения ИК-спектра ~ 2 mg лиофилизированной биомассы *E. cloacae* K-7 ресуспендировали в 0.200 mL дистиллированной воды, наносили 0.100 mL полученной суспензии на гладкую поверхность диска из стекла ZnSe (CVD-ZnSe, „R'AIN Optics", Дзержинск, РФ; диаметр 2.5 cm, толщина 2 mm) и высушивали при 45°C в течение суток (формировалась достаточно равномерная тонкая пленка, плотно прилегающая к поверхности ZnSe). Использовали ИК фурье-спектрометр Nicolet 6700 („Thermo Electron Corporation", США) с разрешением 4 cm^{-1}; иные детали измерений описаны ранее [12].

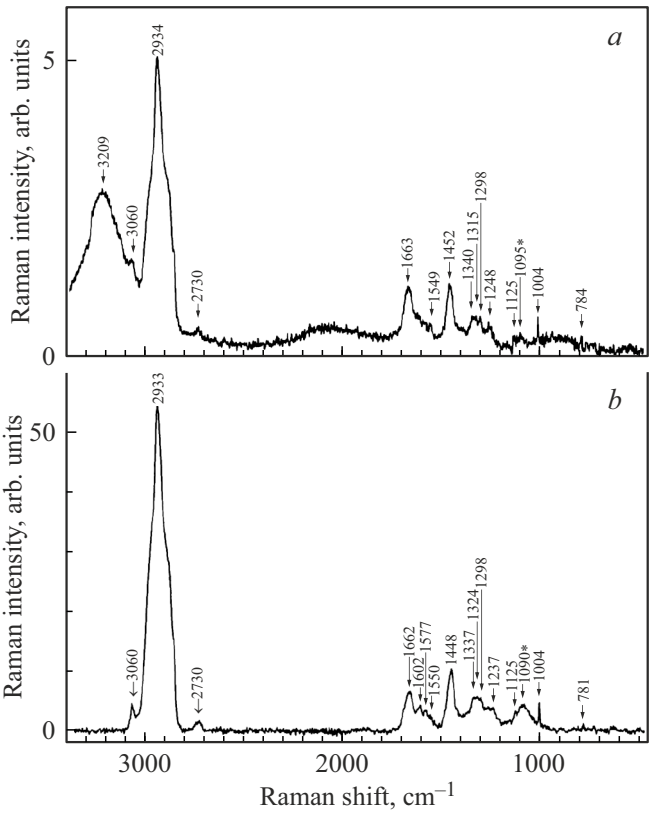

Рис. 1. Спектры КРС образцов свежей (*a*) и лиофилизированной (*b*) биомассы бактерии *Enterobacter cloacae* K-7. (Знаком * на спектрах отмечена широкая область поглощения стекла (около 1090 cm^{-1}) пробирки, в которой находился образец).

Результаты и обсуждение

На спектре КРС свежей биомассы (рис. 1, *a*) следует отметить наличие интенсивной сильно уширенной типичной полосы валентных колебаний OH-групп присутствующей в образце воды, связанных сильными водородными связями, ν(O–H) с максимумом около 3210 cm^{-1}. Некоторый вклад уширенной слабой полосы, соответствующей ножничным (деформационным) колебаниям H–O–H (около 1640 cm^{-1}), заметен при сравнении соотношения интенсивностей соседних полос биомассы (при ~ 1663 и ~ 1450 cm^{-1}; см. ниже) на рис. 1, *a* и 1, *b*. За исключением этих отличий, на обоих спектрах КРС доминирует составная полоса с максимумом ~ 2934 cm^{-1}, включающая наиболее интенсивные в КРС полосы валентных колебаний ν(C–H) различных алифатических групп (в диапазоне $\sim 3000-2800$ cm^{-1}; эти полосы слабее в ИК-спектрах; рис. 2). Из основных можно отметить также полосы клеточных белков — амид-I (более слабые в спектрах КРС широкие полосы около 1663 cm^{-1}, перекрывающиеся с поглощением

ν(C=C) остатков ненасыщенных жирных кислот), амид-II ($\sim 1550\,\mathrm{cm}^{-1}$, слабые в спектрах КРС и перекрывающиеся с полосой ν(C=C) индольного ядра триптофана) и амид-III (слабые; $\sim 1250-1240\,\mathrm{cm}^{-1}$); полосы деформационных колебаний δ(C–H) алифатических групп (при ~ 1450 и $\sim 1340-1315\,\mathrm{cm}^{-1}$), полосы ДНК/РНК (при ~ 1125 и $784-781\,\mathrm{cm}^{-1}$), а также характерную узкую полосу плоскостных деформационных (скелетных) колебаний бензольных циклов фенилаланина и триптофана около $1004\,\mathrm{cm}^{-1}$ [3,5,6,28].

Из сравнения данных рис. 1, *a, b* очевидно, что присутствие значительного количества воды в свежей биомассе не приводит к маскировке или сдвигу основных полос колебаний функциональных групп биомакромолекул, характерных для бактерий, в спектре КРС в сравнении с лиофилизированными клетками *E. cloacae*. На обоих спектрах на рис. 1, *a* и 1, *b* максимумы и относительные интенсивности основных полос, характерных для спектров КРС грамотрицательных бактерий (см., например, [3,6,9,28]), близки или совпадают.

Следует отметить, что использование бромида калия (KBr) как оптически прозрачного вещества при пробоподготовке лиофилизированной биомассы для измерений спектров КРС (см. подраздел „Измерение спектров КРС“) не оказывало заметного влияния на положение и относительную интенсивность полос (рис. 1, *b*). Известно, однако, что использование полярной матрицы KBr при пробоподготовке биологических образцов (включая биомассу бактерий) для ИК-спектроскопии может приводить к существенному сдвигу полос полярных функциональных групп [11]. В нашем случае отсутствие заметного эффекта KBr в спектре КРС (рис. 1, *b*) может определяться двумя основными факторами. Во-первых, в отличие от ИК-спектров наиболее интенсивными в спектрах КРС являются полосы колебаний малополярных и неполярных функциональных групп. Во-вторых, в настоящей работе содержание биомассы в смеси с KBr для измерения спектра КРС составляло 30 wt.%, тогда как для ИК-спектроскопии при использовании матрицы KBr содержание образца в смеси составляет обычно 1–2 wt.%. Значительно больший избыток KBr в последнем случае (особенно в случае прессования образца в таблетки [11]), очевидно, может оказывать более сильное влияние на полярные связи.

По виду спектра КРС свежей биомассы (рис. 1, *a*), полученной центрифугированием водной суспензии клеток, можно полагать, что по соотношению относительных интенсивностей широкой сильной полосы ν(O–H) воды с максимумом $\sim 3209\,\mathrm{cm}^{-1}$ и наиболее интенсивной полосы ν(C–H) биоорганической составляющей (при $\sim 2934\,\mathrm{cm}^{-1}$) возможна количественная оценка содержания биомассы клеток в водной суспензии (иными словами, плотности суспензии культуры). Такая возможность определяется корреляцией относительных интенсивностей полос определенных функциональных групп в спектрах КРС с общим относительным их содержанием в исследуемом образце. Для подобной количественной оценки тем не менее требуются дополнительные калибровочные измерения спектров КРС суспензий клеток с определенными значениями плотности (с известным содержанием воды в суспензии).

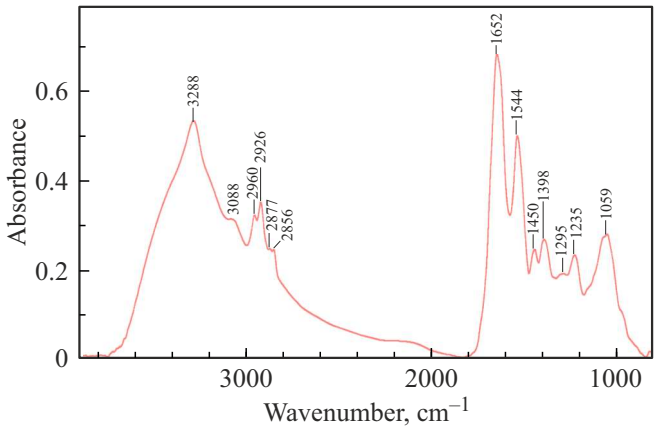

Рис. 2. ИК-спектр лиофилизированной биомассы бактерии *Enterobacter cloacae* K-7.

В ИК-спектре лиофилизированной биомассы *E. cloacae* K-7 (рис. 2) присутствуют все основные полосы, характерные для высушенных грамотрицательных бактерий (см., например, [1,12,13,28]), а именно широкая полоса ν(O–H) различных биомолекул и следов воды ($\sim 3600-2700\,\mathrm{cm}^{-1}$), на фоне которой проявляются полосы ν(N–H) амидов ($3288\,\mathrm{cm}^{-1}$) и ν(C–H) алифатических групп ($3000-2800\,\mathrm{cm}^{-1}$); характерные полосы клеточных белков — амид-I ($1652\,\mathrm{cm}^{-1}$), амид-II ($1544\,\mathrm{cm}^{-1}$) и амид-III ($1235\,\mathrm{cm}^{-1}$), полоса деформационных колебаний δ(C–H) алифатических групп ($1450\,\mathrm{cm}^{-1}$), полоса симметричных валентных колебаний $\nu_s(\mathrm{COO}^-)$ карбоксилатных групп при $\sim 1398\,\mathrm{cm}^{-1}$ (соответствующая ей полоса антисимметричных валентных колебаний $\nu_{as}(\mathrm{COO}^-)$, проявляющаяся обычно около $1580-1650\,\mathrm{cm}^{-1}$, маскируется белковыми полосами амид-I и амид-II), область поглощения клеточных полисахаридов ($\sim 1200-950\,\mathrm{cm}^{-1}$).

Спектры КРС и ИК-спектр бактерии *E. cloacae* K-7 во всем среднем ИК-диапазоне ($\sim 3500-500\,\mathrm{cm}^{-1}$) (рис. 1 и 2) публикуются, насколько нам известно, впервые (в частности, спектр КРС для свежей биомассы (без высушивания), полученной из планктонной культуры).

В литературе опубликованы спектры КРС (для возбуждающих лазеров с $\lambda = 785$ и 514.5 nm) штамма *E. cloacae* A5149 в воздушно-сухом виде в диапазоне $1800-500\,\mathrm{cm}^{-1}$ [29] и образцов (в воздушно-сухом виде или с агаровых подложек) клинических изолятов *E. cloacae* [30,31]. Все они показывают аналогичное положение основных полос ключевых функциональных групп биомолекул. Опубликованы также ИК-спектры *E. cloacae* (ATCC 13047) в диапазоне $1800-1000\,\mathrm{cm}^{-1}$ [32], биопленок дикого штамма *E. cloacae* 67E1 и нескольких мутантных штаммов по продукции биопленок [33].

Для сравнения отметим, что по ИК фурье-спектрам даже структурно более сложных клеток дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*) в работе [34] не было обнаружено различий между свежеприготовленной биомассой (измерения были проведены на быстро высушенных в вакууме тонких пленках) и лиофилизированной биомассой, в том числе с помощью хемометрического анализа спектроскопических данных, что согласуется с данными настоящей работы.

Выводы

Сравнительный анализ спектров КРС образцов свежей (отделенной центрифугированием и отмытой от культуральной среды; без высушивания) и лиофилизированной биомассы планктонной культуры бактерии *Enterobacter cloacae* K-7, а также ИК-спектра последней показал, что для свежей биомассы наличие значительного количества воды в образце в случае спектров КРС не приводит к маскировке или сдвигу основных полос функциональных групп биомакромолекул, характерных для бактерий, в сравнении с лиофилизированными клетками. Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования обоих способов пробоподготовки бактериальных биомасс — влажной биомассы после центрифугирования или после лиофильной сушки — для общего сравнительного анализа их биомакромолекулярного состава методом спектроскопии КРС, а также (в случае лиофилизированной биомассы) методом ИК-спектроскопии).

Благодарности

Авторы признательны сотрудникам Коллекции ризосферных микроорганизмов, поддерживаемой в ИБФРМ РАН (Саратов, Россия; https://collection.ibppm.ru), за предоставление штамма *Enterobacter cloacae* K-7.

Измерения методом ИК фурье-спектроскопии выполнены авторами в Центре коллективного пользования научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии „Симбиоз“ (ИБФРМ РАН, Саратов, Россия) с использованием ИК фурье-спектрометра Nicolet 6700 („Thermo Electron Corporation“, США) и программы обработки спектров OMNIC (версия 8.2.0.387), поставляемой вместе со спектрометром.

Финансирование работы

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант 24-26-00209).

Соблюдение этических стандартов

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием людей или животных в качестве объектов.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

[1] A. Kassem, L. Abbas, O. Coutinho, S. Opara, H. Najaf, D. Kasperek, K. Pokhrel, X. Li, S. Tiquia-Arashiro. Front. Microbiol., **14**, 1304081 (2023). DOI: 10.3389/fmicb.2023.1304081

[2] A.A. Камнев, A.B. Тугарова. Журн. аналит. химии, **78** (10), 914 (2023). DOI: 10.31857/S0044450223100109 [A.A. Kamnev, A.V. Tugarova. J. Analyt. Chem., **78** (10), 1320 (2023). DOI: 10.1134/S1061934823100106].

[3] G. Pezzotti. J. Raman Spectrosc., **52** (12), 2348–2443 (2021). DOI: 10.1002/jrs.6204

[4] K.S. Lee, Z. Landry, A. Athar, U. Alcolombri, P. Pramoj Na Ayutthaya, D. Berry et al. Nat. Microbiol., **9**, 1152–1156 (2024). DOI: 10.1038/s41564-024-01656-3

[5] E. Fardelli, A. D'Arco, S. Lupi, D. Billi, R. Moeller, M. Cestelli Guidi. Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc., **288**, 122148 (2023). DOI: 10.1016/j.saa.2022.122148

[6] I. Saraeva, D. Zayarny, E. Tolordava, A. Nastulyavichus, R. Khmelnitsky, D. Khmelenin, S. Shelygina, S. Kudryashov. Chemosensors, **11** (7), 361 (2023). DOI: 10.3390/chemosensors11070361

[7] C. Lima, H. Muhamadali, R. Goodacre. Sensors, **22** (10), 3928 (2022). DOI: 10.3390/s22103928

[8] A.V. Tugarova, P.V. Mamchenkova, Yu.A. Dyatlova, A.A. Kamnev. Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc., **192**, 458–463 (2018). DOI: 10.1016/j.saa.2017.11.050

[9] M.G. Fernández-Manteca, A.A. Ocampo-Sosa, D.F. Vecilla, M.S. Ruiz, M.P. Roiz, F. Madrazo, J. Rodríguez-Grande, J. Calvo-Montes, L. Rodríguez-Cobo, J.M. López-Higuera, M.C. Fariñas, A. Cobo. Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc., **319**, 124533 (2024). DOI: 10.1016/j.saa.2024.124533

[10] Ravi teja Vulchi, V. Morgunov, R. Junjuri, T. Bocklitz. Molecules, **29** (19), 4748 (2024). DOI: 10.3390/molecules29194748

[11] A.A. Kamnev, A.V. Tugarova, Yu.A. Dyatlova, P.A. Tarantilis, O.P. Grigoryeva, A.M. Fainleib, S. De Luca. Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc., **193**, 558–564 (2018). DOI: 10.1016/j.saa.2017.12.051

[12] A.A. Kamnev, Yu.A. Dyatlova, O.A. Kenzhegulov, A.A. Vladimirova, P.V. Mamchenkova, A.V. Tugarova. Molecules, **26** (4), 1146 (2021). DOI: 10.3390/molecules26041146

[13] A.A. Kamnev, Yu.A. Dyatlova, O.A. Kenzhegulov, Yu.P. Fedonenko, S.S. Evstigneeva, A.V. Tugarova. Molecules, **28** (4), 1949 (2023). DOI: 10.3390/molecules28041949

[14] M.Z. Iqbal, K. Singh, R. Chandra. Cleaner Eng. Technol., **23**, 100845 (2024). DOI: 10.1016/j.clet.2024.100845

[15] R. Singh, S. Kaur, S.S. Bhullar, H. Singh, L.K. Sharma. J. Sustain. Agric. Environ., **3**, e12085 (2024). DOI: 10.1002/sae2.12085

[16] N. Khan, S. Ali, M.A. Shahid, A. Mustafa, R.Z. Sayyed, J.A. Curá. Cells, **10** (6), 1551 (2021). DOI: 10.3390/cells10061551

[17] B.N. Aloo, V. Tripathi, B.A. Makumba, E.R. Mbega. Front. Plant Sci., **13**, 1002448 (2022). DOI: 10.3389/fpls.2022.1002448

[18] A.A. Agboola, T.A. Ogunnusi, O.G. Dayo-Olagbende, O.B. Akpor. Open Microbiol. J., **17** (1), e187428582308080 (2023). DOI: 10.2174/18742858-v17-230823-2023-8
[19] R.P. Singh, D.M. Pandey, P.N. Jha, Y. Ma. PloS One, **17** (5), e0267127 (2022). DOI: 10.1371/journal.pone.0267127
[20] Ye.V. Kryuchkova, G.L. Burygin, N.E. Gogoleva, Yu.V. Gogolev, M.P. Chernyshova, O.E. Makarov, E.E. Fedorov, O.V. Turkovskaya. Microbiol. Res., **169**, 99–105 (2014). DOI: 10.1016/j.micres.2013.03.002
[21] K.K. Meena, N.K. Taneja, A. Ojha, S. Meena. Ann. Phytomed., **12** (1), 706–716 (2023). DOI: 10.54085/ap.2023.12.1.76
[22] C.A. Morgan, N. Herman, P.A. White, G. Vesey. J. Microbiol. Meth., **66** (2), 183–193 (2006). DOI: 10.1016/j.mimet.2006.02.017
[23] A.H. García. J. Biosci., **36** (5), 939–950 (2011). DOI: 10.1007/s12038-011-9107-0
[24] J.T. Lennon, S.E. Jones. Nat. Rev. Microbiol., **9**, 119–130 (2011). DOI: 10.1038/nrmicro2504
[25] A.J. Székely, S. Langenheder. ISME J., **11**, 1764–1776 (2017). DOI: 10.1038/ismej.2017.55
[26] E.T. da Cunha, A.M. Pedrolo, A.C.M. Arisi. Arch. Microbiol., **205** (5), 190 (2023). DOI: 10.1007/s00203-023-03542-8
[27] S. Mahmud, S. Khan, M.R. Khan, J. Islam, U.K. Sarker, G.M.M.A. Hasan, M. Ahmed. J. Food Proc. Preserv., **46**, e17123 (2022). DOI: 10.1111/jfpp.17123
[28] O.A. Kenzhegulov, Yu.A. Dyatlova, S.A. Klimin, A.V. Tugarova, A.A. Kamnev. Microbiology (Moscow), **93** (Suppl. 1), S153–S156 (2024). DOI: 10.1134/S0026261724609692
[29] M.L. Paret, S.K. Sharma, L.M. Green, A.M. Alvarez. Appl. Spectrosc., **64** (4), 433–441 (2010).
[30] F. SantAna de Siqueira e Oliveira, H.E. Giana, L. Silveira, Jr. J. Biomed. Optics, **17** (10), 107004 (2012). DOI: 10.1117/1.JBO.17.10.107004
[31] A. Nakar, A. Wagenhaus, P. Rösch, J. Popp. Analyst, **147**, 3938–3946 (2022). DOI: 10.1039/d2an00822j
[32] J. Le Galudec, M. Dupoy, L. Duraffourg, V. Rebuffel, P.R. Marcoux. Microb. Biotechnol., **18**, e70093 (2025). DOI: 10.1111/1751-7915.70093
[33] R.J. Delle-Bovi, A. Smits, H.M. Pylypiw. Amer. J. Anal. Chem., **2**, 212–216 (2011). DOI: 10.4236/ajac.2011.22025
[34] S. Correa-García, M. Bermúdez-Moretti, A. Travo, G. Déléris, I. Forfar. Anal. Methods, **6**, 1855–1861 (2014). DOI: 10.1039/C3AY42322K