

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов –
обособленное структурное подразделение
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Федерального исследовательского центра
«Саратовский научный центр Российской академии наук»

На правах рукописи

Дятлова Юлия Анатольевна

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

1.5.2. Биофизика

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Тугарова Анна Владимировна

Саратов – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. Обзор литературы	12
1.1 ИК-фурье-спектроскопия в микробиологических исследованиях	12
1.1.1 ИК-фурье-спектроскопия биологических макромолекул	14
1.1.1.1 ИК-фурье-спектроскопия белковых молекул	18
1.1.1.2 ИК-фурье-спектроскопия полисахаридов	22
1.1.1.3 ИК-фурье-спектроскопия других биологических макромолекул	26
1.1.2 ИК-фурье-спектроскопия микробиологических образцов	28
1.1.2.1 ИК-фурье-спектроскопия биопленок и планктонных культур	29
1.1.2.2 ИК-фурье-спектроскопия бактериальных культур, культивируемых в стрессовых условиях	31
1.1.3 Пробоподготовка микробиологических образцов	33
1.2 Синтез полигидроксиалканоатов – стратегия выживания бактерий в стрессовых условиях	36
1.2.1 Характеристика полигидроксиалканоатов	37
1.2.2 Метаболический путь синтеза поли-3-гидроксибутирата	40
1.2.3 Прикладное значение полигидроксиалканоатов	45
1.3 Характеристика бактерий рода <i>Azospirillum</i>	48
1.3.1 Биопленки как форма существования бактерий рода <i>Azospirillum</i> в естественных условиях	50
1.3.2 Синтез поли-3-гидроксибутирата бактериями рода <i>Azospirillum</i> в стрессовых условиях	53
ГЛАВА 2. Материалы и методы	57
2.1 Объекты исследования	57
2.2 Среда для культивирования бактерий	58
2.3 Условия культивирования	59
2.3.1 Выращивание биопленок	59
2.3.2 Выращивание бактерий в условиях трофического стресса	59
2.3.3 Культивирование бактерий для синтеза поли-3-гидроксибутирата ...	60
2.4 Выделение и очистка поли-3-гидроксибутирата	60
2.5 ИК-фурье-спектроскопия	61
2.5.1 Пробоподготовка образцов для измерения методом ИК-фурье-спектроскопии	61
2.5.2 Расчет содержания поли-3-гидроксибутирата и полисахаридной составляющей	62

2.5.3	Метод расчета величины β	63
2.5.4	Математическая обработка ИК-фурье-спектров	64
2.6	Статистическая обработка результатов	65
ГЛАВА 3. Результаты и обсуждение		66
3.1	Методологические аспекты	66
3.1.1	Влияние полярной матрицы на биологические образцы	66
3.1.2	Пробоподготовка для анализа бактериальных образцов методом просвечивающей ИК-фурье-спектроскопии	71
3.1.3	Влияние присутствия молекул связанной воды в поли-3-гидроксибутирате на степень упорядоченности полимера	80
3.1.4	Алгоритм расчета содержания компонентов биомассы на основании соотношения площадей полос	86
3.2	Синтез поли-3-гидроксибутирата бактериями штаммов <i>A. baldaniorum</i> Sp245, <i>A. brasilense</i> Sp7 и <i>A. brasilense</i> Cd при трофическом стрессе различной степени интенсивности	89
3.3	Изучение планктонных культур и биопленок бактерий вида <i>A. baldaniorum</i>	97
3.3.1	Анализ макрокомпонентного состава биопленки, образованной штаммом <i>A. baldaniorum</i> Sp245	97
3.3.2	Сравнительное изучение биопленок, сформированных бактериями штамма <i>A. baldaniorum</i> Sp245 и его мутанта <i>A. baldaniorum</i> Sp245.1610	102
3.3.3	Сравнительное исследование синтеза поли-3-гидроксибутирата диким штаммом <i>A. baldaniorum</i> Sp245, мутантом <i>A. baldaniorum</i> Sp245.1610 и комплементированными производными последнего...	109
ЗАКЛЮЧЕНИЕ		111
ВЫВОДЫ		112
БЛАГОДАРНОСТИ		113
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ		114
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ		115

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Одним из наиболее распространенных инструментальных методов во многих областях исследований является ИК-фурье-спектроскопия (ИКФС). Метод основан на регистрации колебательных переходов групп атомов при непосредственном поглощении веществом ИК излучения. Благодаря своей информативности, применимости к широкому спектру образцов, находящихся в различных физиологических состояниях, малом времени измерений и неинвазивности ИКФС представляет собой эффективный метод качественного и количественного анализа различных видов биологических объектов. В последние десятилетия всё большую популярность ИКФС приобретает в различных областях микробиологии. Большое количество статей, опубликованных за это время, показывают, что ИКФС может использоваться для быстрой дифференциации и идентификации микроорганизмов, анализа клеточного метаболизма уже известных бактериальных культур, идентификации отдельных внутриклеточных метаболитов и др. [1–13]. Однако, несмотря на распространенность метода и наличие баз данных спектров для идентификации и дифференциации различных видов бактерий, актуальной проблемой до настоящего момента является разработка оптимальной методики пробоподготовки различных микробиологических образцов и алгоритма анализа получаемых ИК-спектров для биоаналитического применения ИКФС.

В естественных условиях обитания бактерии, как правило, существуют в виде биопленок и постоянно находятся под воздействием внешних факторов, в том числе – стрессовых, к которым относятся: недостаток питательных веществ, негативные физические, химические и/или биологические факторы. Для адаптации к ним бактерии выработали множество защитных механизмов, одним из которых является накопление резервных питательных веществ, таких как, например, полигидроксиалканоаты (ПГА) [14]. Одним из наиболее изученных ПГА является поли-3-гидроксибутират (ПГБ). К синтезу ПГБ способны бактерии рода *Azospirillum*, представляющие собой грам-отрицательные бактерии, многие из

которых образуют ассоциации с корнями многих растений [15–18]. Естественной средой обитания для большинства бактерий рода *Azospirillum* является почва, где эти бактерии колонизируют корни растений и в ряде случаев их межклеточные пространства, существуя в виде сложных биопленок [15]. Бактерии рода *Azospirillum* используются в сельскохозяйственной биотехнологии в качестве бактериальных удобрений, т.к. способны оказывать за счет разных механизмов, таких как синтез фитогормонов, стимулирование роста корневой системы и др., позитивное действие на рост и развитие растений [16, 19].

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

Степень разработанности темы исследования. Первые работы, посвященные ИК-спектроскопии как используемому в микробиологических исследованиях методу, в частности, для идентификации и классификации бактерий, были опубликованы еще в 50-х гг. XX века [20, 21]. Однако на тот момент несовершенство приборов и трудоемкость измерений ограничивали ее применение. К 90-м гг. XX века стали появляться более чувствительные, доступные и удобные в использовании ИК-фурье-спектрометры со значительно более высоким разрешением, что вместе с активным развитием молекулярно-генетических методов в микробиологии позволило эффективно использовать метод ИК-спектроскопии в микробиологических исследованиях.

К настоящему времени накоплен обширный пул исследований, посвященных идентификации и дифференциации различных видов и штаммов микроорганизмов методом ИКФС [4, 6, 7, 22–24]. В 1985 г. в работе Д. Науманна [25] были предприняты первые попытки стандартизировать и создать общие протоколы по

анализу данных ИК-спектров микроорганизмов с последующей доработкой в экспериментах [2, 3]. Помимо дифференциации и идентификации, метод ИКФС активно используется при качественном и количественном анализе как общего макрокомпонентного состава [12, 13, 18, 26–36], так и при анализе отдельных компонентов бактериальных клеток, таких как: белковые структуры [37–41], различные углеводы [42–48], липиды [49–51], липополисахариды [52] и др. [53–55].

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

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

1. Разработать методику пробоподготовки и алгоритм анализа ИК-спектров бактериальных образцов, находящихся в разных физиологических состояниях (планктонная культура, биопленка), измеренных в режиме пропускания.

2. Провести сравнительный анализ синтеза ПГБ бактериями штаммов *A. baldaniorum* Sp245, *A. brasilense* Sp7 и *A. brasilense* Cd, культивируемых при трофическом стрессе разной степени интенсивности.

3. Изучить планктонные культуры и биопленки, образованные бактериями вида *A. baldaniorum*.

Научная новизна. Предложена оригинальная методика пробоподготовки бактериальных образцов, находящихся в разных физиологических состояниях; предложен алгоритм анализа ИК-спектров при изучении их методом ИК-фурье-спектроскопии. Показано, что использование полярной матрицы (KBr) для пробоподготовки сухой бактериальной биомассы приводит не только к сдвигу ряда полос полярных функциональных групп биомолекул в ИК-спектрах, но и индуцирует кристаллизацию неупорядоченной фракции внутриклеточного сложного полиэфира (ПГБ). Для образцов ПГБ показана зависимость степени его упорядоченности от толщины пленки образца: для более толстых пленок полимера характерно увеличение доли аморфной структуры, что связано с нарушением дальнего порядка из-за присутствия в образце молекул связанной воды. Впервые с применением метода ИКФС проведено сравнительное изучение планктонных культур и биопленок, образованных бактериями штамма *A. baldaniorum* Sp245 и его мутанта. Установлены различия между диким штаммом и его мутантом в обоих физиологических состояниях. Показано влияние продуктов генов липидного метаболизма (*fabG1* и *fabH1*) на процессы накопления ПГБ на примере штамма-мутанта *A. baldaniorum* Sp245.1610 и его комплементированных производных. С применением метода ИКФС изучены особенности накопления ПГБ бактериями штаммов *A. baldaniorum* Sp245 и *A. brasilense* Sp7 и Cd при трофическом стрессе различной степени интенсивности.

Научно-практическая значимость исследования. Предложены методика пробоподготовки, подходящая для дальнейшего их использования при изучении разнообразных бактериальных образцов методом ИКФС в режиме пропускания, и алгоритм оценки относительного содержания различных макрокомпонентов в бактериальных клетках.

Изучен метаболический отклик бактерий рода *Azospirillum* на воздействие такого стрессового фактора, как трофический стресс. На примере штамма *A. baldaniorum* Sp245 и комплементированных производных его мутанта *A. baldaniorum* Sp245.1610 показано влияние продуктов генов липидного метаболизма *fabG1* и *fabH1* на синтез ПГБ, что существенно для устойчивости бактерий в неблагоприятных условиях. Полученные результаты способствуют лучшему пониманию функционирования защитных механизмов бактерий рода *Azospirillum* и могут быть полезны при разработке стратегии использования азоспирилл в агробιοтехнологии, а также при создании новых рекомбинантных штаммов азоспирилл, обладающих большей устойчивостью к разнообразным негативным факторам.

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

Методология и методы исследования. В работе был использован метод ИКФС, а также комплекс современных микробиологических, биохимических и биофизических методологических подходов.

Работа выполнена в Институте биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленном структурном подразделении Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук» в рамках тем: «Роль биомакромолекул и низкомолекулярных веществ в механизмах адаптации растительно-микробных ассоциаций в составе

антропобиоценозов к условиям аридного климата» (№ ГР 01201359049, 2013–2017 гг.); «Структурно-функциональная характеристика биополимеров и надмолекулярных комплексов ризосферных бактерий, определяющих формирование ассоциативного симбиоза как формы адаптации к условиям обитания» (№ ГР АААА-А17-117102740102-2, 2018 г.); «Выявление структурно-функциональных особенностей биополимеров и надмолекулярных комплексов ризосферных бактерий, детерминирующих образование ассоциативного симбиоза как формы адаптации к условиям обитания» (№ ГР АААА-А19-119011890162-3, 2019–2021 гг.).

Диссертационная работа выполнялась при частичной поддержке грантом Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) № 17-08-01696-а «Исследование биотехнологически важных особенностей метаболизма ризобактерий рода *Azospirillum* с помощью методов молекулярной спектроскопии» (2017–2019 гг.; рук. – проф. А.А. Камнев) и грантом Российского научного фонда (РНФ) № 22-26-00142 «Исследование биопленок агроботехнологически важных штаммов ризобактерий рода *Azospirillum* методами колебательной спектроскопии» (2022–2023 гг.; рук. – проф. А.А. Камнев).

Положения, выносимые на защиту:

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

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

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

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

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

Достоверность и обоснованность результатов обеспечена тем, что в работе использованы современные методы исследования и сертифицированное научно-исследовательское оборудование; данные экспериментальных измерений статистически обработаны с помощью общепринятой методологии. ИК-спектры автоматически обрабатывались при измерении, а также при их обработке с помощью статистического пакета анализа, входящего в программное обеспечение.

Апробация работы. Материалы были представлены и обсуждались на 19 научных мероприятиях – 13 международных (или с международным участием) и 6 российских: Региональных научных конференциях «Исследования молодых ученых и студентов в биологии и экологии» (Саратов, 15–18 апреля 2013 г.), Региональной научной конференции «Исследования молодых ученых и студентов в биологии и экологии» (Саратов, 20–24 апреля 2015 г.), XXVII Зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 9–12 февраля 2015 г.), International Turkish Congress on Molecular Spectroscopy (Анталия, Турция, 13–18 сентября, 20015 г.), Всероссийской молодежной научной конференции с международным участием «Биотехнология, биоинформатика и геномика растений и микроорганизмов» (Томск, 26–28 апреля 2016 г.), XIII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук» (Томск, 26–29 апреля 2016 г.), 33rd European Congress on Molecular Spectroscopy

(EUCMOS) (Сегед, Венгрия, 30 июля – 04 августа 2016 г.), VIII Всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (Саратов, 26–30 сентября 2016 г.), Международной научно-практической конференции «Вавиловские чтения – 2016» (Саратов, 24–25 ноября 2016 г.), 2nd Caparica Christmas Conference on Sample Treatment (Кошта-да-Капарика, Португалия, 5–7 декабря 2016 г.), Colloquium Spectroscopicum Internationale XL (Пиза, Италия, 11–16 июня 2017 г.), I Российском микробиологическом конгрессе (Пушино, 17–18 октября 2017 г.), Втором междисциплинарном молодежном научном форуме с международным участием «Новые материалы» (Москва, 21–24 ноября 2017 г.), Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов–2018» (Москва, 9–13 апреля 2018 г.), Международной научной конференции «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» PLAMIC 2018 (Уфа, 13–17 июня 2018 г.), 43rd FEBS Congress “Biochemistry Forever” (Прага, Чешская Республика, 7–12 июля 2018 г.), 18th European Congress on Biotechnology (Женева, Швейцария, 1–4 июля 2018 г.), Colloquium Spectroscopicum Internationale XLI (Мехико, Мексика, 9–14 июня 2019 г.)

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 27 печатных работ, из них: 9 публикаций представлено в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ, из которых 8 – в журналах, входящих в международные базы данных и системы цитирования Web of Science и Scopus; 18 публикаций в российских и международных сборниках трудов и материалов научных конференций.

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

Глава 1. Обзор литературы

1.1 ИК-фурье-спектроскопия в микробиологических исследованиях

В настоящее время во многих областях исследований все более широкое применение находят методы колебательной спектроскопии, к которым относится и ИКФС. Она позволяет проводить быстрый анализ разнообразных и сложных микробиологических объектов без их разрушения, т.е. в их нативном состоянии, фактически *in situ*, что обеспечило данному методу популярность и применимость при решении различных микробиологических задач [12, 13, 18, 27, 56–63].

Метод ИКФС основан на регистрации колебательных переходов групп атомов при непосредственном поглощении веществом ИК излучения. ИК-спектры бактериальных клеток представляют собой сложные «изображения» общего химического состава компонентов клетки, в которые входят белки, полисахариды, липиды, нуклеиновые кислоты и т.д. [56]. Для понимания ИК-спектров микробных клеток, а также для идентификации отдельных составляющих, таких как капсулы, эндоспоры, внутриклеточные включения или гранулы запасных веществ, требуются знания об общем составе, типах клеток, а также химических структурах, которые вносят вклад в ИК-спектр [57, 64]. «Брутто»-состав бактериальных клеток представлен в Таблице 1.

Химический состав и структура бактериальных клеток разнообразны и достаточно специфичны, и за последние десятилетия было опубликовано большое количество работ, показывающих, что метод ИКФС может быть использован как для качественного и количественного анализа состава компонентов клеток, так и для идентификации и дифференциации различных видов и штаммов микроорганизмов [4, 6, 7, 23, 24].

Метод ИКФС не ограничивается анализом бактериальных культур, но также используется для анализа других биологических объектов, например, дрожжей и грибов [1, 5, 65].

Таблица 1 – Общий биомакромолекулярный состав бактериальной клетки [8, 56]

Компонент	Содержание, % от сух. вещ. клетки
ДНК	2–4
РНК	5–15
Белки	40–60
Липиды	10–15
Углеводы	10–20

Широкое применение метода объясняется наличием у ИКФС существенных преимуществ, из которых к основным можно отнести скорость и специфичность, а также применимость метода фактически к любым биологическим образцам в любом физическом состоянии. Исследуемые объекты могут быть растворами, вязкими жидкостями, суспензиями, неоднородными твердыми образцами любой степени кристалличности, пленками или порошками. В случае образцов бактериальных культур количество биомассы может быть сокращено до нескольких сотен клеток [56].

Наиболее важной, сложной и трудоемкой частью исследования является анализ и интерпретация ИК-спектров. Помимо сложностей с интерпретацией и анализом полученных результатов, на данный момент также остается актуальной проблема пробоподготовки образцов, что объясняется многообразием микробиологических объектов и, как следствие, почти полным отсутствием на настоящий момент стандартизированных протоколов или методологий по пробоподготовке микробиологических объектов. Разнообразие методологических подходов при использовании ИКФС в микробиологии приводит к широкому разбросу уровня и качества ИК-спектроскопических данных в публикациях.

1.1.1 ИК-фурье-спектроскопия биологических макромолекул

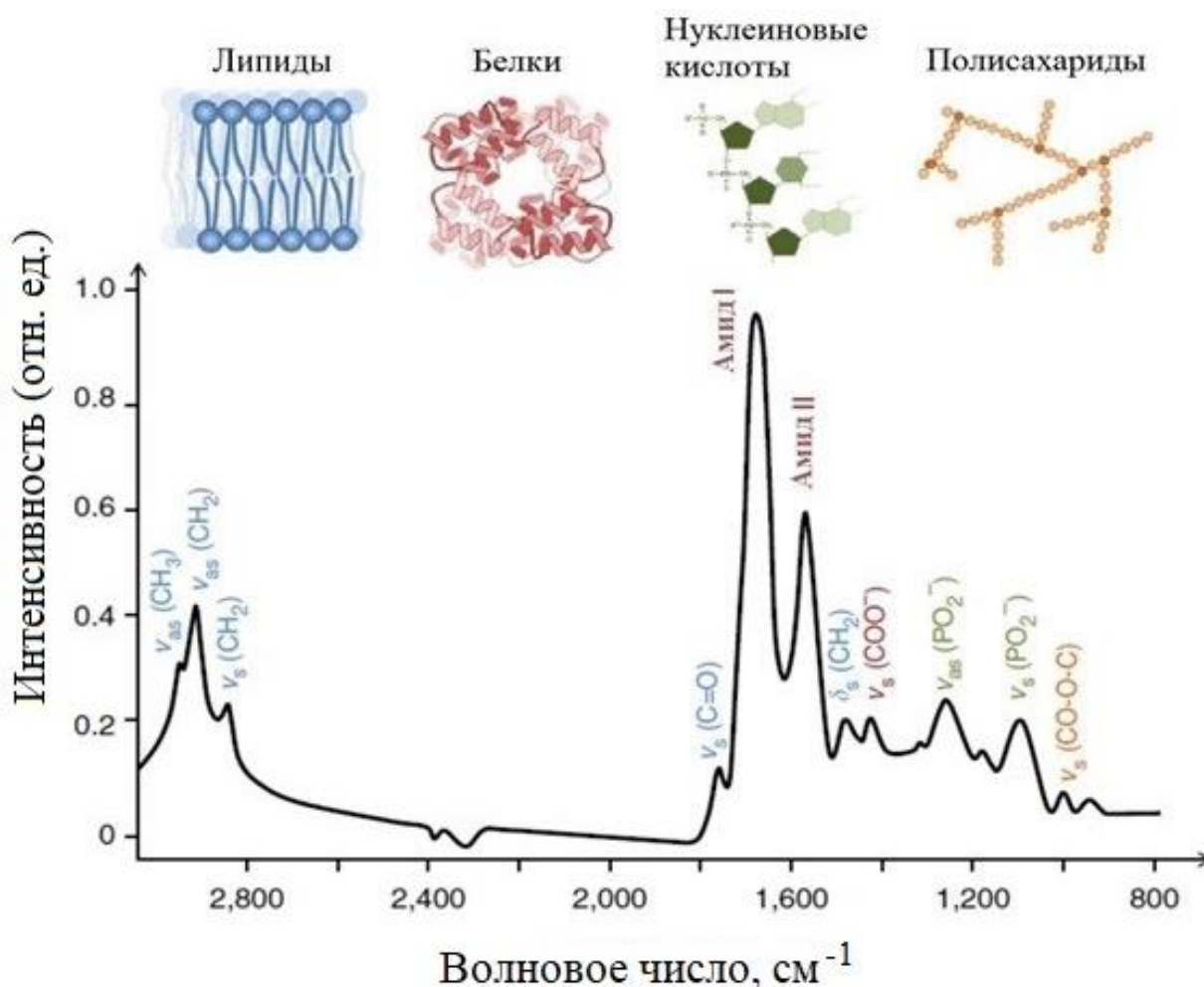
Наиболее информативная область в ИК-спектроскопии при изучении биологических объектов находится между 4000 и 800 см^{-1} (средняя ИК-область). При прохождении ИК-излучения через образец происходит возбуждение колебательных уровней функциональных групп молекул, которым соответствуют определенные частоты (энергии) колебаний, отвечающие энергиям химических связей. Всем макромолекулам, входящим в состав бактериальных клеток, соответствуют определенные функциональные группы и, соответственно, свои частоты колебаний. Поглощение ИК-излучения функциональными группами отражается на ИК-спектрах в виде полос различной интенсивности.

В ИК-спектроскопии, как правило, используют волновое число ν , являющееся величиной, обратной длине волны и имеющее размерность см^{-1} (обратные сантиметры, $\nu = 1/\lambda$, где λ – длина волны в см). Пример ИК-спектра с полосами, соответствующими основным биомacroмолекулам, представлен на Рисунке 1.

К основным областям, выделяемым на ИК-спектрах биологических образцов (Таблица 2), относятся [56, 57]:

1. Область между 4000 и 3100 см^{-1} , вклад в которую вносят связи O–H ($\sim 3400 \text{ см}^{-1}$) и N–H (амид А $\sim 3200 \text{ см}^{-1}$ и амид В $\sim 3030 \text{ см}^{-1}$).

2. Область между 3100 и 2800 см^{-1} валентных колебаний C–H функциональных групп $-\text{CH}_3$, $>\text{CH}_2$ и $>\text{CH}-$ (или $=\text{CH}-$), соответствующих цепям жирнокислотных остатков в липидах, колебаниям боковых цепей некоторых аминокислот и др. Дополнительная информация может быть получена при анализе области между 1470 и 1350 см^{-1} , где также локализованы различные деформационные колебания этих функциональных групп. В некоторых случаях наблюдается слабая полоса около 3015–3030 см^{-1} , соответствующая валентным колебаниям двойной связи группы $=\text{C}-\text{H}$ в ненасыщенных жирнокислотных остатках.



v – валентные колебания, δ – деформационные колебания,
 s – симметричные и as – антисимметричные колебания

Рисунок 1 – Пример ИК-спектра биологического образца, измеренного в режиме пропускания (клеток карциномы молочных желез) [66]

3. Область между 1800 и 1500 cm^{-1} соответствует полосам амид I и амид II в белках, формирующим самые интенсивные полосы на спектрах практически всех бактериальных образцов. Поскольку ИКФС является методом «усреднения», области амид I и амид II не дают информации о единичном белке (указывая в случае полосы амид I на доминирующий тип вторичной структуры). Полезная информация может быть получена и при анализе области около 1740 cm^{-1} , соответствующей валентным колебаниям $>C=O$ функциональных групп сложноэфирных фрагментов в липидах.

Таблица 2 – Соотнесение некоторых полос ИК-спектров с функциональными группами в биомакромолекулах микробиологических образцов [56]

Волновое число, см ⁻¹	Колебание связи, функциональная группа
~3500	$\nu(\text{O-H})$, гидроксо-группы
~3200	$\nu(\text{N-H})$ амид А, белки
2959	$\nu_{\text{as}}(\text{C-H})$, $-\text{CH}_3$
2934	$\nu_{\text{as}}(\text{C-H})$, $>\text{CH}_2$
2921	$\nu_{\text{as}}(\text{C-H})$, $>\text{CH}_2$ в жирных кислотах
2898	$\nu(\text{C-H})$ в метиновых группах
2872	$\nu_{\text{s}}(\text{C-H})$ в $-\text{CH}_3$
2852	$\nu_{\text{s}}(\text{C-H})$, $>\text{CH}_2$ в жирных кислотах
1741	$\nu(>\text{C=O})$ в эфирах
1715	$\nu(>\text{C=O})$ в эфирах
~1695; ~1685; ~1675	Амид I, антипараллельные β -слои и β -изгибы в белках
~1655	Амид I, α -спираль
~1637	Амид I, β -структуры
1548	Амид II
1515	«Тирозиновая» связь
1468	$\delta(\text{C-H})$ в $>\text{CH}_2$
~1400	$\nu_{\text{s}}(\text{C=O})$ в COO^-
~1310–1240	Амид III, белки
~1250–1220	$\nu_{\text{as}}(\text{P=O})$ в PO_2^- , фосфодиэфиры
~1200–900	$\nu(\text{C-O})$, $\nu(\text{C-C})$, $\delta(\text{C-O-H})$, $\delta(\text{C-O-C})$, полисахариды
1085	$\nu_{\text{s}}(\text{P=O})$ в PO_2^-
~720	C–H маятниковые (rocking) колебания в $>\text{CH}_2$
900–600	Область «истинных отпечатков пальцев»

Вклад в эту область вносят также валентные колебания связей $>C=O$, $>C=N$, $>C=C<$ в ДНК и РНК. Слабые полосы нуклеиновых кислот между 1600 и 1700 cm^{-1} часто перекрываются более интенсивными полосами амид I, поскольку относительное количество ДНК или РНК не превышает 10% от клеточной массы, а относительное содержание указанных групп в них невелико.

4. Полосы поглощения в области 1300–1500 cm^{-1} соответствуют деформационным колебаниям групп $>CH_2$ и $-CH_3$ в липидах и белках. Слабый пик имеется около 1400 cm^{-1} , который, вероятно, соответствует симметричным валентным колебаниям $-COO^-$ боковых цепей аминокислот или жирных кислот (ЖК, полоса соответствующих антисимметричных валентных колебаний $-COO^-$ около ~ 1590 cm^{-1} обычно маскируется более сильными полосами амид I и II).

5. Около 1230 cm^{-1} находятся полосы, характерные для различных антисимметричных валентных колебаний $>P=O$ в фосфодиестерах, фосфатах и моноэстере фосфатной функциональной группы. Другие валентные колебания $>P=O$ соответствуют фосфолипидам или, например, фосфорсодержащим углеводам, таким как тейхоевые и липотейхоевые кислоты.

6. Спектральная область между 1200 и 900 cm^{-1} в основном соответствует симметричным валентным колебаниям $-PO_2^-$ в функциональных группах нуклеиновых кислот, а также полосам валентных колебаний $C-O-C$ и $C-O-P$ в различных олиго- и полисахаридах.

7. Область 900–600 cm^{-1} , область «истинных отпечатков пальцев», характеризуется множеством слабых пиков. Эта область включает в себя полосы поглощения, соответствующие колебаниям ароматического кольца фенилаланина, тирозина, триптофана и различных нуклеотидов. За исключением лишь нескольких пиков (полоса около 720 cm^{-1} связи CH_2 в ЖК), реальные соотношения в этой области затруднительны.

Экспрессность, чувствительность и возможность изучения образцов в разном физическом состоянии (газы, жидкость, твердые вещества) обусловили за последние десятилетия все более активное применение метода ИКФС в

исследованиях различных биомакромолекул, надмолекулярных биологических структур, клеток и тканей.

1.1.1.1 ИК-фурье-спектроскопия белковых молекул

Благодаря своей высокой чувствительности метод ИКФС на данный момент широко используется для изучения белковых структур, позволяя получать информацию об их конформации [37–40], а также динамике и процессах фолдинга [41, 67].

Все белковые структуры формируются при протекании реакции конденсации аминокислот с образованием пептидной связи (Рисунок 2), которая локализуется в группировке $-\text{CONH}-$ и характеризуется специфическим распределением энергии между атомами. Это, а также связи, возникающие в пептидной группе (Рисунок 2А), определяют появление на ИК-спектрах полос поглощения, свойственных лишь для пептидов (Рисунок 2Б, Таблица 3) [68].

Наибольший вклад в область амид I ($\sim 1620\text{--}1680\text{ см}^{-1}$) вносят валентные колебания связи $\text{C}=\text{O}$ ($\sim 80\%$) и меньший – валентные колебания связи $\text{C}-\text{N}$ ($\sim 20\%$), а также деформационные колебания связей $\text{C}-\text{C}-\text{N}$ и $\text{N}-\text{H}$. Стоит отметить, что в этой же области спектра наблюдаются и деформационные («ножничные») колебания связей $\text{H}-\text{O}-\text{H}$ (следы воды), что может создавать трудности при анализе полученных спектров и требует тщательной подготовки образцов [37, 69]. В области амид II ($\sim 1530\text{--}1550\text{ см}^{-1}$) вносят вклад колебания связей $\text{N}-\text{H}$ и $\text{C}-\text{N}$, 60% и 40%, соответственно [37, 38, 69, 70].

Основной вклад в область амид III ($\sim 1300\text{ см}^{-1}$) вносят деформационные колебания связи $\text{N}-\text{H}$ и валентные колебания связи $\text{C}-\text{N}$. Также небольшой вклад в данной области вносят связи $\text{C}=\text{O}$ (деформационные колебания) и $\text{C}-\text{C}$ (валентные колебания). В полипептидах состав этой полосы достаточно сложен, поскольку зависит от наличия связей с аминокислотными остатками, а также в силу того, что деформационные колебания связи $\text{N}-\text{H}$ дают несколько полос поглощения в области от 1400 до 1200 см^{-1} [69].

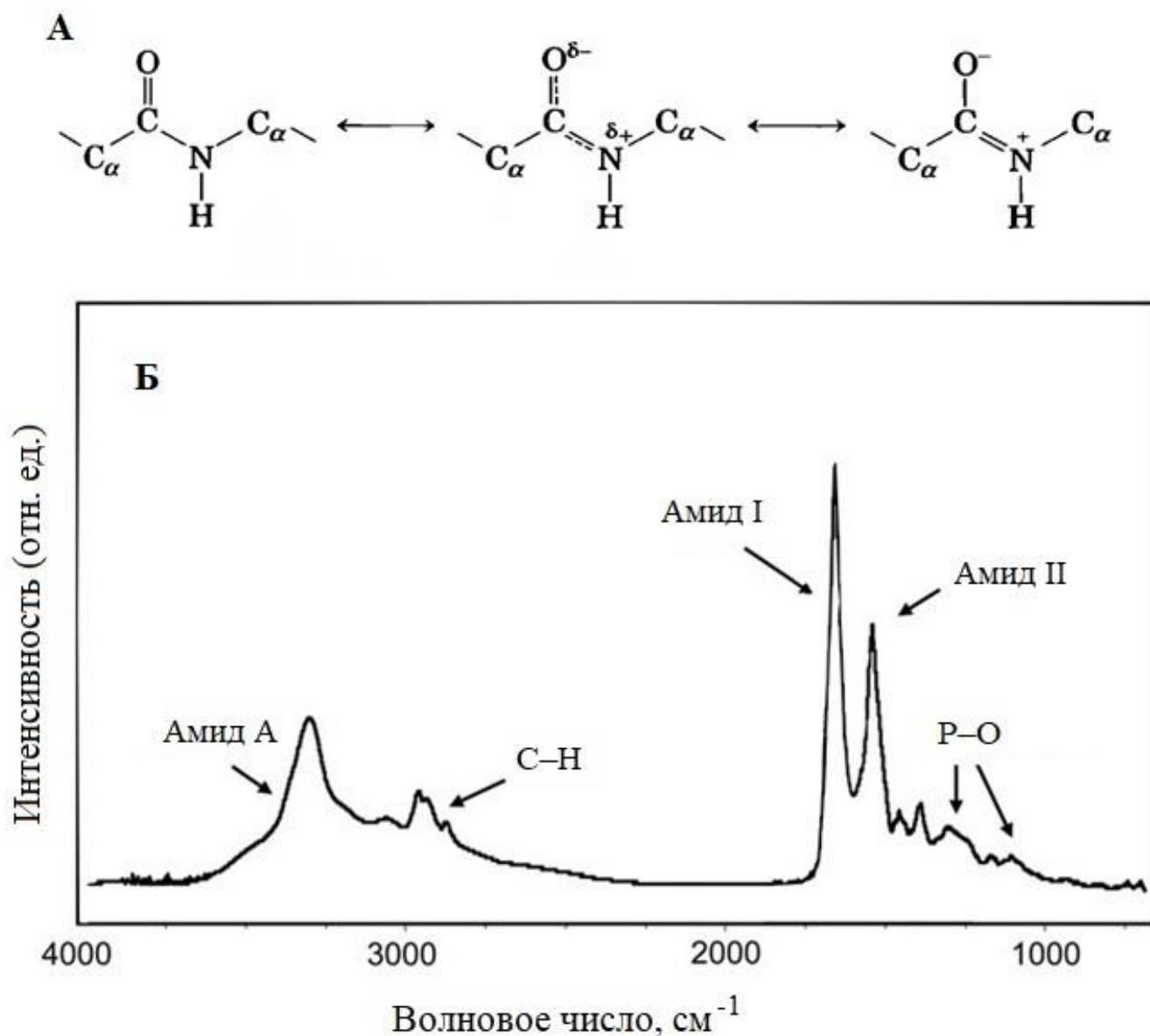


Рисунок 2 – Пептидная связь, возникающая между аминокислотами (А), и ИК-спектр типичного белка (Б) [71, 72]

В сложных многокомпонентных биологических системах в этой же области ($\sim 1300\text{--}1200\text{ см}^{-1}$) проявляются также асимметричные валентные колебания групп -PO_2^- в фосфолипидах и нуклеиновых кислотах [56].

Высокая разрешающая способность делает метод ИКФС весьма популярным для идентификации компонентов вторичной структуры белковых образцов. Важную роль в формировании определенной вторичной структуры играет наличие различных внутримолекулярных водородных связей.

Таблица 3 – Основные функциональные группы спектров белков и пептидов и соответствующие им типы связей [68, 70]

Амид	Волновое число, см ⁻¹	Функциональная группа
A	~3300	$\nu(\text{N-H})$
B	~3100	обертон амид-II: $\delta(\text{N-H}), \nu(\text{C-N})$
I	~1650	$\nu(\text{C=O}), \nu(\text{C-N}), \delta(\text{C-C-N}), \nu(\text{C-C-N})$
II	~1550	$\delta(\text{N-H}), \nu(\text{C-N}), \delta(\text{C=O}), \nu(\text{C-C})$
III	~1300	$\nu(\text{C-N}), \delta(\text{N-H}), \nu(\text{C-C}), \delta(\text{C=O})$
V	~725	$\delta(\text{N-H}), \delta(\text{C-N})$
IV	~625	$\delta(\text{C=O}), \nu(\text{C-C}), \delta(\text{C-N-C})$
VI	~600	$\delta(\text{C=O}), \delta(\text{C-N})$
VII	~200	$\delta(\text{N-H}), \delta(\text{C-N}), \delta(\text{C=O})$

Примечания: ν – валентные колебания (изменение длины связи между двумя атомами), δ – деформационные (изменение углов между атомами).

Классическое понятие водородной связи подразумевает взаимодействие между водородом и атомами, обладающими сильной электроотрицательностью, например, N, O и другими [73]. Однако за последние десятилетия определение водородной связи было расширено и дополнено понятием слабой водородной связи, которая представляет собой взаимодействие между атомом водорода и другими атомами, из которых один или оба обладают слабой или средней электроотрицательностью [74]. Подобные связи имеют решающее значение при формировании вторичной и третичной структуры белков, нуклеиновых кислот, играют важную роль при формировании свойств полимеров и др. [75].

Наибольший вклад связи, формирующие вторичную структуру белка, вносят в область амид I. Положение, интенсивность и форма данной полосы могут меняться в зависимости от соотношения типов вторичной структуры (Таблица 4) [68]. α -Спирали дают основную полосу поглощения около 1655 см⁻¹ и еще одну, значительно менее интенсивную, при более низких волновых

числах ($\sim 1645 \text{ см}^{-1}$). Положение полосы может меняться в зависимости от растворителя, в котором находится белок. Максимум поглощения данной полосы находится при $1640\text{--}1655 \text{ см}^{-1}$ для обычной воды (H_2O) и смещается в более низкочастотную область при использовании в качестве растворителя D_2O ($1629\text{--}1640 \text{ см}^{-1}$). Также положение полосы смещается в более низкочастотную область, когда спираль сворачивается в спиральную катушку с увеличением ее длины. Короткие α -спирали с менее чем шестью остатками не всегда дают типичные для α -спирали полосы поглощения, но могут давать несколько полос по всей области амид I [69].

Таблица 4 – Элементы вторичной структуры белка и соответствующие им области колебаний [37, 69, 70]

Вторичная структура	Область амид I, волновое число, см^{-1}
α -спираль	1640–1660
3_{10} -спираль	1660–1670
неупорядоченная	1640–1648
β -слои	1630–1645 1680–1685
β -повороты	1665–1690

Антипараллельные β -слои дают сильную полосу поглощения при 1630 см^{-1} и более слабую полосу вблизи 1685 см^{-1} . Положение этих полос практически не зависит от количества амидных групп в полипептидных цепях, но зависит от количества этих цепей. Кроме того, основная полоса поглощения параллельных β -слоев смещается в сторону меньших волновых чисел с увеличением числа полипептидных цепей [76]. Скручивание антипараллельных β -слоев вызывает смещение полосы поглощения к более высоким значениям волновых чисел.

Для параллельных β -слоев характерна полоса поглощения при более высоких значениях волновых чисел, чем для антипараллельных β -слоев. Параллельные

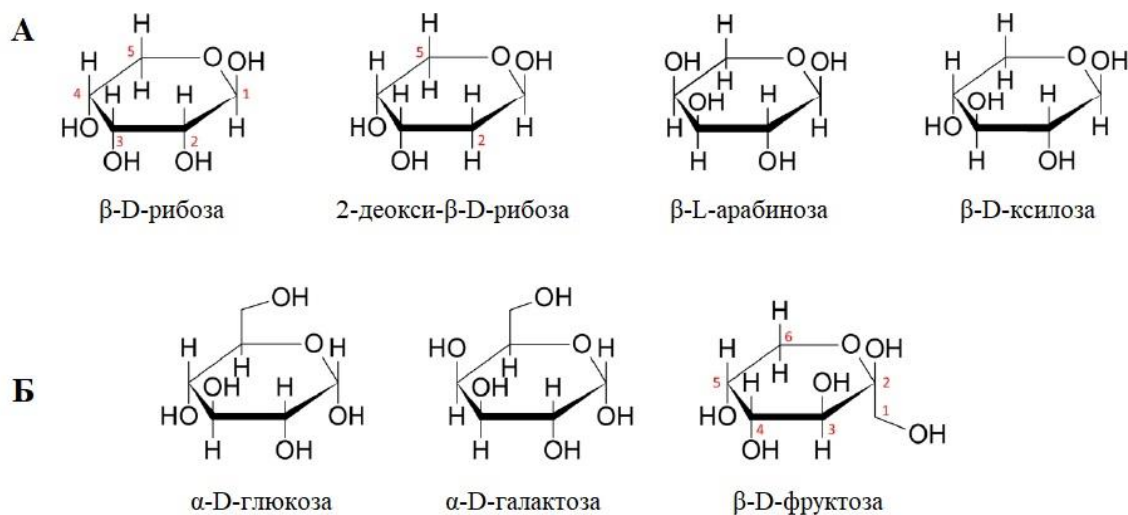
β -слои демонстрируют меньший разрыв между их основной и дополнительными полосами [69].

Было высказано предположение, что вторичная структура белка также может быть определена на основе анализа полос поглощения в области амид III [77]. В полосу амид III, как правило, вносят вклад валентные колебания связи C–N, деформационные колебания N–H, а также небольшой вклад дают валентные колебания связей C–C и деформационные колебания C=O [78]. Кроме того, значительное влияние оказывают веерные деформационные колебания группы $>CH_2$ боковой цепи и колебания $\nu(PO_2^-)$. Таким образом, в амид III вносят вклад множество различных связей, что делает область мало подходящей для определения вторичной структуры белка [79].

К настоящему моменту метод ИКФС широко применяется при изучении белковой составляющей. Однако стоит отметить, что основная литература посвящена изучению либо отдельно выделенных белковых структур, либо пептидных образцов с уже известной аминокислотной последовательностью. В силу своей чувствительности и высокой точности ИКФС представляет собой перспективный инструмент для изучения белковой составляющей в таком сложном многокомпонентном образце, как бактериальная культура, позволяя осуществлять анализ не только белковой составляющей клеток в целом, но и ее вторичной структуры.

1.1.1.2 ИК-фурье-спектроскопия полисахаридов

Основные углеводороды состоят лишь из трех видов атомов (углерода, кислорода и водорода) и имеют одинаковый состав (Рисунок 3). Углеводы, за редким исключением, имеют близкие или совпадающие колебания частот, несмотря на различия по распределению энергии, зависящие от имеющихся в молекулах групп и связей между ними.



А – пентозы;

Б – гексозы

Рисунок 3 – Молекулярные структуры моносахаридов [80]

ИКФС особенно чувствительна к геометрии молекул, системам внутри- и межмолекулярных взаимодействий. Это обусловило значение колебательной спектроскопии при исследовании структуры и свойств углеводов. Результаты теоретических расчетов колебательных спектров углеводов позволили сформулировать несколько основных выводов относительно спектроскопии полисахаридов [81]:

1. Частоты колебаний углеводных молекул вне зависимости от их химической структуры, за редкими исключениями, идентичны или близки к таковым у α , β -D-глюкозы и α -D-галактозы.

2. Наблюдаются значительные различия по распределениям энергий в молекуле в зависимости от определенных групп и связей, несмотря на идентичные или близкие частоты колебаний. Это приводит к значительным различиям в интенсивности полос на колебательных спектрах отдельных молекул.

3. «Скелет» молекул углеводов состоит из последовательных комбинаций связей С–О и С–С; каждая конкретная связь С–С и С–О характеризуется определенным набором колебательных частот.

4. Частоты колебаний строго соответствуют связям С–О и С–С в молекулах углеводов, структура которых зависит от стереохимических факторов.

5. Поскольку частоты колебаний функциональных групп С–О и С–С заметно различаются и перераспределяются относительно друг друга при переходе от одного соединения к другому, на ИК- и спектрах комбинационного рассеяния (КР) некоторых углеводов наблюдается различие в интенсивностях этих полос. Одни и те же полосы могут быть интенсивны и на ИК-спектре, и на спектре КР для разных соединений.

Высокая чувствительность метода к геометрии углеводов вместе с тем приводит к значительным трудностям при анализе ИК-спектров. Сложности в интерпретации и анализе получаемых данных можно объяснить, учитывая следующие факторы: (а) различные конфигурации «скелета» углеводной молекулы, опосредованные химическим составом; (б) положение боковых гидроксильных и оксиметиленовых групп; (в) особенности трехмерной конфигурации молекул в системе с водородными связями [81].

На данный момент методом ИКФС изучен широкий спектр углеводов, таких как α -глюкоза, β -глюкоза, α -галактоза, β -галактоза, α -манноза, β -манноза [45], фруктоза [46], полисахаридов, таких как целлюлоза [47, 48], хитин [82], а также смеси различных углеводов и полисахаридов [42–44].

Типичный ИК-спектр полисахарида, выделенного из биомассы бактерий, представлен на Рисунке 4. Выделяют несколько областей, колебания которых характерны для ИК-спектров всех полисахаридов:

а) Область $3600\text{--}2800\text{ см}^{-1}$, соответствует валентным колебаниям связей С–Н и О–Н;

б) Область $1650\text{--}1590\text{ см}^{-1}$, соответствует валентным колебаниям группы --NH_2 [82]. Также в эту область могут вносить свой вклад связи в молекулах воды. Чтобы исключить возможность регистрации ИК-спектрометром колебаний этой группы, исследуемый образец высушивают при высоких температурах ($\sim 100^\circ\text{C}$) [48];

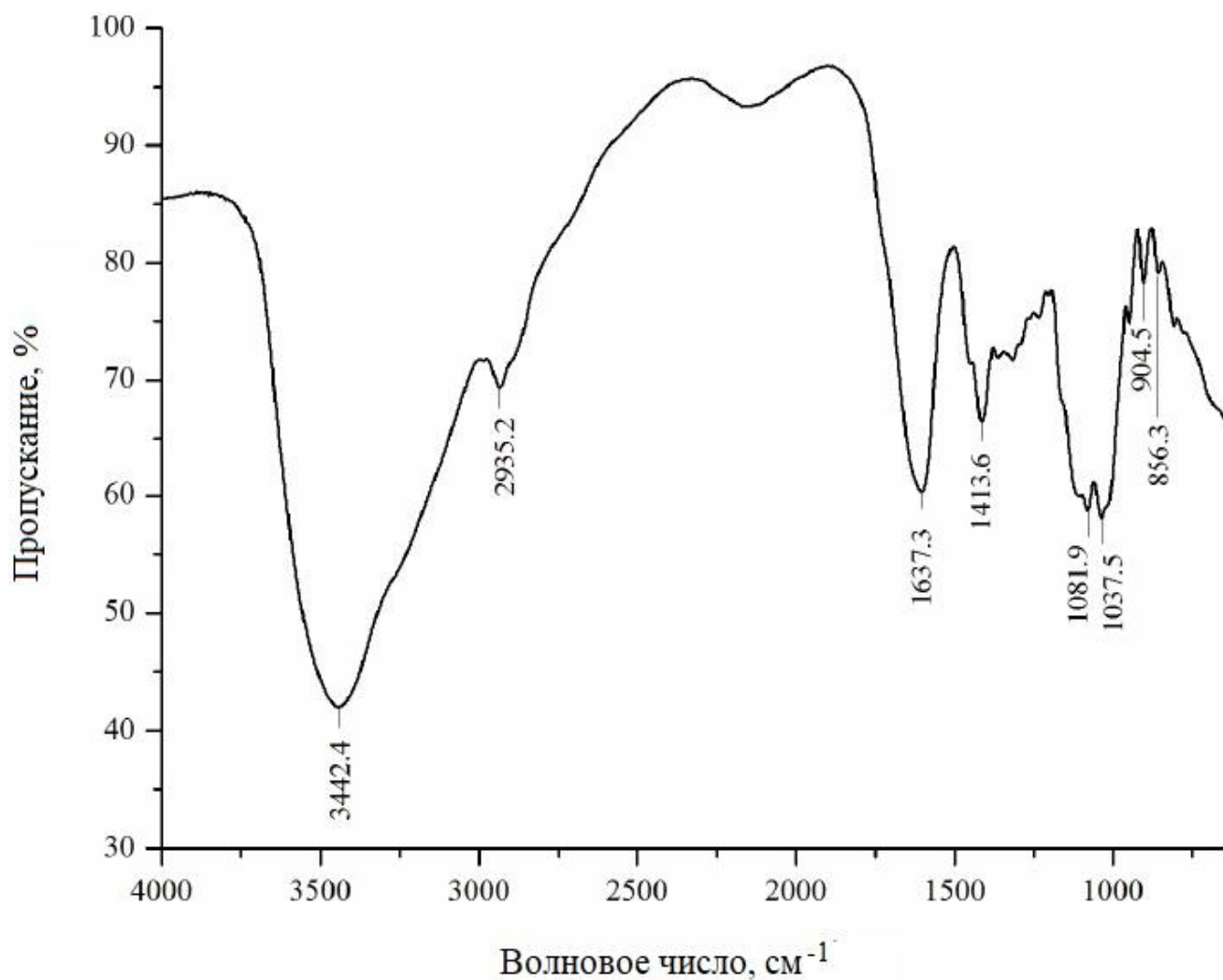


Рисунок 4 – ИК-спектр полисахарида, выделенного из бактерий вида *Sphingomonas sanxanigenens* [83]

в) Область 1500–1200 см⁻¹, соответствует функциональным группам (C–H), (O–H) и –CH₂–;

г) Область «отпечатков пальцев» при 1800–600 см⁻¹, интенсивность и положение частот в которой специфичны для пектиновых полисахаридов [42];

д) Область 1200–950 см⁻¹, область колебаний связей C–O;

е) Область 950–700 см⁻¹, область колебаний боковых групп (C–O–H, C–C–H, O–C–H);

ж) Область менее 700 см⁻¹, область, отвечающая за связи в основной цепи: C–C–O, C–C–C [32, 45, 84].

Для наиболее точного анализа спектров полисахаридов следует брать область выше $\sim 1400 \text{ см}^{-1}$, так как область от 960 до 1400 см^{-1} сочетает в себе колебания от многих групп и связей, что затрудняет анализ этой области [82].

Метод ИКФС используется в основном при исследовании структуры полисахаридов. Так, в работе М. Т. Каккамо с соавт. было изучено влияние высоких температур на экзополисахарид, выделенный из бактерий штамма *Bacillus licheniformis* В3-15 [85]. Экзополисахариды, выделенные из бактерий штаммов *Weissella confusa* OF126, *Bacillus sonorensis* MJM60135 и *Synechocystis sp.* PCC6803, также идентифицированы и охарактеризованы с помощью ИКФС, определены их основные полосы на ИК-спектрах и соотнесены с функциональными группами [86–88]. Метод использовался для изучения структуры различных водорастворимых полисахаридов, выделенных из разных источников: коры корня *Periploca laevigata*; бактерий вида *Sphingomonas sanxanigenens*; семян растений вида *Artemisia sphaerocephala* Krasch [83, 89, 90].

Стоит отметить, что несмотря на множество положительных аспектов ИКФС, данный метод не находит широкого применения при изучении полисахаридов, что объясняется необходимостью использовать его в сочетании с другими физико-химическими методами.

1.1.1.3 ИК-фурье-спектроскопия других биологических макромолекул

Метод ИКФС также используется для изучения липидов, мембрано-связанных ферментов, молекул ДНК и других сложных соединений. В работе С. Татуляна ИКФС использовалась для характеристики липидных монослоев и бислоев, количественного описания белок-липидных взаимодействий и сопутствующих структурных эффектов, белок-белок взаимодействий в мембранах и анализа механизмов связанных с мембраной ферментов [49].

ИКФС нашла применение и при изучении липополисахаридов. Клетки *Proteus mirabilis* с ранее охарактеризованными липополисахаридами использовались в качестве модельного объекта для их изучения с применением

метода ИКФС в режиме диффузного отражения (ДО, diffuse reflectance infrared fourier transform spectroscopy, DRIFTS mode) [52].

Возможность применения ИКФС для изучения липидов была продемонстрирована при определении ламеллярной структуры липида А, выделенного из бактерий вида *Salmonella minnesota*, а также для сравнительной характеристики синтетически синтезированного липида А и его естественного аналога, выделенного из бактерий вида *Escherichia coli* [50]. Исследование включало определение меж- и внутримолекулярных конформаций единичных функциональных групп гидрофобных и гидрофильных фрагментов. На полученных спектрах были продемонстрированы отличия природного и синтетического липида А [51].

Ранее теми же авторами с использованием метода нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО, attenuated total reflection, ATR) ИКФС была использована при сравнительном изучении природных и синтетически синтезированных плоских мембранных многослойных систем, состоящих из фосфолипидов и сфинголипидов [91].

В работе Ш. Ху с соавт. метод ИКФС был использован при изучении влияния сильного статического магнитного поля на биологические системы на примере бактерий вида *E. coli* и *Staphylococcus aureus* [55]. Было показано, что воздействие магнитного поля оказывало большее влияние на *E. coli* по сравнению с *S. aureus*. Основные изменения для ИК-спектров бактериальных культур наблюдались в области 1500–1200 см⁻¹. Анализ данной области с использованием математической обработки (разложения полос) показал, что состав и конформация нуклеиновых кислот, белковой составляющей и ЖК *E. coli* изменялись под воздействием магнитного поля. Данными авторами с использованием метода ИКФС на примере тех же патогенных видов бактерий (*E. coli* и *S. aureus*) была изучена их фотокаталитическая инактивация в водной суспензии иодида серебра и диоксида титана (AgI/TiO₂) при облучении светом видимой области [54]. Метод ИКФС позволил обнаружить и идентифицировать промежуточные продукты разложения клеточной стенки, такие как альдегиды, кетоны и карбоновые кислоты.

В работе Э. Шлейхера с соавт. метод ИКФС использовали для мониторинга процесса образования димеров тимидина в ДНК бактерий вида *E. coli* под воздействием ультрафиолетового излучения и их восстановления путем катализа светочувствительной фотолиазы [53].

Несмотря на большой потенциал ИКФС, его высокую чувствительность и специфичность, на сегодняшний день данный метод редко применяется для анализа отдельных макромолекулярных соединений, что, вероятно, связано с необходимостью комбинировать его с другими химическими, биохимическими и физическими методами для подтверждения и корректного анализа получаемых данных.

1.1.2 ИК-фурье-спектроскопия микробиологических образцов

ИКФС измеряет спектр всего биохимического состава биологического образца, которым, в случае микробиологических исследований, может служить колония микроорганизмов одного вида или штамма. Большое количество статей, опубликованных в последние десятилетия показывает, что ИКФС может использоваться для быстрой дифференциации и идентификации микроорганизмов [1–6, 22, 23, 65, 92–97]. Попытки стандартизировать и создать общие протоколы по анализу данных ИК-спектров микроорганизмов были предприняты еще в 1985 г. в работе Д. Науманна [25], и, позднее, были доработаны в экспериментах Д. Хелма с соавт. [2, 3]. К настоящему моменту преобладающая часть работ по данной тематике все еще посвящена вопросам идентификации и классификации различных штаммов бактерий на основе имеющихся спектроскопических баз данных [22, 23, 92]. Идентификация происходит путем сравнения ИК-спектра неизвестного микроорганизма со справочной базой данных. Алгоритм идентификации неизвестных штаммов основан на вычислении d -значений, или спектральных расхождений [2, 3, 56]; d -значения – это безразмерная мера схожести, которая может принимать значения от 0 до 2000, где ноль указывает на идентичные

спектры, 1000 – относительное расхождение спектров и 2000 – абсолютное расхождение спектров. d-Значения вычисляются по формуле:

$$d_{y1y2} = (1 - r_{y1y2}) * 1000, \quad (1)$$

где r – коэффициент Пирсона;

y_1 и y_2 – значения оптической плотности двух сравниваемых спектров.

Данный алгоритм был опробован на штаммах таких родов как *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Legionella* и на бактериях вида *E. coli*. Сравнение проводилось с базой данных, содержащей 139 бактериальных ИК-спектров в качестве контроля и охватывающей широкий спектр грамотрицательных и грамположительных бактерий [3].

Однако несмотря на это, к настоящему моменту все еще отсутствуют методики пробоподготовки и анализа, которые были бы применимы ко всему разнообразию образцов, используемых в микробиологических исследованиях.

Помимо идентификации и классификации микроорганизмов, метод ИКФС применяется в микробиологических исследованиях для анализа клеточного метаболизма [9–11], для выявления изменений, происходящих в бактериальных клетках в ответ на различные стрессовые условия, или для идентификации конкретных метаболитов [12, 13, 98].

1.1.2.1 ИК-фурье-спектроскопия биопленок и планктонных культур

Метод ИКФС позволяет изучать микроорганизмы, находящиеся в различных физиологических состояниях, таких, как планктонные культуры или биопленки. Первые работы по изучению биопленок методом ИКФС были опубликованы более 35 лет назад [31]. Сейчас метод все более активно используется при: изучении общего биохимического состава биопленок; характеристики экзополисахаридов, выделенных из матрикса; определении влияния pH на формирование биопленки; сравнительном анализе планктонных культур и биопленок [32–36, 99].

Для ИК-спектров биопленок были определены некоторые особенности. Показано, что к некоторым спектроскопическим маркерам роста биопленки

относятся определенные полосы в области поглощения углеводов, антисимметричных и симметричных колебаний карбоксилат-ионов и колебаний сложных эфиров [3, 31].

Для бактерий вида *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* методом ИКФС были показаны конформационные изменения белковых структур во внеклеточном полимерном матриксе [100]. ИК-спектры внеклеточного полимерного матрикса биопленки указали, что клетки бактерий взаимодействуют с пиритом посредством образования связей P–O–Fe, индуцируя бактериальную адгезию и накопление внеклеточного полимерного матрикса, приводя к образованию биопленок.

На ИК-спектрах внеклеточного полимерного матрикса, выделенного из биопленок вида *Bordetella pertussis*, показано усиление полос, соответствующих функциональным группам уроновых кислот в полисахаридах. При этом для биопленок, выращенных на подложках из ZnSe и проанализированных методом ИКФС *in situ*, т.е. без разрушения ее структуры, показаны различия по сравнению с планктонной культурой в полосах, соответствующих белкам (амид I и амид II). Также было установлено увеличение содержания O-ацетильных групп в полисахаридах клеток биопленок по сравнению с планктонными культурами [32].

Влияние ацетилирования полисахаридов на формирование биопленок было изучено в работе Д. Нивенса с соавт. [34]. Методом ИКФС было установлено, что мукоидный штамм *Pseudomonas aeruginosa* FRD1, на ИК-спектрах биопленок которого присутствовали более интенсивные полосы, соответствующие O-ацетильным группам в альгинатах, формировал более толстые пленки по сравнению с немучоидными штаммами этого вида: полосы, соответствующие O-ацетильным группам, отличались меньшей интенсивностью. В работе Г. Лорит с соавт. измерения в режиме НПВО показали, что полисахариды продуцируются *Xylella fastidiosa* на ранних стадиях образования биопленок, тем самым показывая, что в процессах адгезии участвует матрикс биопленок [101].

ИКФС широко используется для решения разнообразных аналитических задач в микробиологии, позволяя проводить качественный анализ бактериальных образцов, например, при обнаружении и систематизации неизвестных штаммов

бактерий. Однако для работы с отдельными макрокомпонентами микробиологических образцов, такими как полисахариды, белки, липиды, ДНК, РНК и другие биомакромолекулы или их комплексы, требующие более тщательного подхода при изучении методом ИКФС, все еще недостаточно проработаны протоколы и методики как пробоподготовки, так и анализа измеряемых ИК-спектров.

1.1.2.2 ИК-фурье-спектроскопия бактериальных культур, культивируемых в стрессовых условиях

В естественных условиях на бактерии воздействует комплекс различных стрессовых факторов, таких, как: экстремальные температуры; осмотическое давление; изменения pH; недостаток O₂ или питательных веществ; УФ-излучение; воздействие тяжелых металлов (ТМ) и др. Это вызывает реакцию клеток, сопровождающуюся во многих случаях изменением состава и/или соотношения ее макрокомпонентов [30, 102, 103].

Все большую популярность при изучении влияния на микроорганизмы различных стрессовых факторов приобретает метод ИКФС. На данный момент опубликованы работы, в которых исследовано воздействие на бактериальные культуры таких неблагоприятных факторов, как: ТМ [12, 13, 18, 26, 28, 29], трофический стресс [27, 98], низкие значения pH [104], температурный стресс, недостаток кислорода [105–107] и др.

Для ризосферных бактерий, к которым относятся бактерии рода *Azospirillum* и *Bacillus*, наиболее распространенными видами стресса являются трофический стресс и воздействие ТМ [102]. Методом ИКФС показано, что ТМ вызывают значительные перестройки в метаболизме штамма-эпифита *A. brasilense* Sp7. Метаболическим ответом на воздействие ТМ для этого штамма являлся синтез ПГБ. Было обнаружено, что ответ эндофитного штамма *A. brasilense* Sp245 на умеренный стресс был значительно менее выражен, чем реакция эпифитного штамма Sp7 [18]. Подобные различия могут быть связаны с различными

экологическими нишами, которые занимают данные штаммы, а также согласуются с последними данными, согласно которым штамм Sp245 отнесен к новому виду *A. baldaniorum* [108].

С помощью ИКФС, в сочетании с другими физическими методами, было изучено влияние ряда ТМ (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} и Pb^{2+}) на бактерии штамма *Bacillus cereus* RC-1. При их воздействии на ИК-спектрах бактерий происходило значительное смещение полос ряда функциональных групп в жирнокислотных остатках и полос, соответствующих белкам. Также наблюдались изменения в положении полос в полисахаридах, являющихся основными компонентами клеточной стенки [28]. В работе П. Динга с соавт. бактерии вида *Bacillus vallismortis* культивировались при добавлении в среду катионов Zn^{2+} ; на ИК-спектрах этих клеток показано значительное усиление интенсивности всех полос внеклеточного полимерного матрикса бактерий, указывающее на индукцию его биосинтеза [29].

Изучены экспрессия генов и биомакромолекулярный состав бактерий вида *E. coli*, культуры которого подвергали воздействию различных неблагоприятных условий: добавление в среду культивирования хлорида натрия, этанола, глицерина, соляной и уксусной кислоты, гидроксида натрия и др.; воздействие экстремальных температур [106]. Анализ ИК-спектров показал увеличение количества ненасыщенных ЖК при добавлении в среду культивирования этанола и при воздействии низких температур. При понижении pH и при воздействии высоких температур происходило снижение их количества. Также претерпевал изменения глеводный состав клетки при воздействии на культуры низких температур.

Методом ИКФС также были выявлены изменения в составе клеточной стенки бактерий вида *Lactobacillus plantarum* после обработки их кислотой. Анализ ИК-спектров показал заметные изменения в полосах, соответствующих углеводам, липидам, белкам и нуклеиновым кислотам для всех культур, подвергшихся воздействию низких значений pH, по сравнению с контролем, что свидетельствует о наличии сложного бактериального стрессового ответа [104].

Одним из основных преимуществ при использовании ИКФС относительно других стандартных методов исследования бактериальных клеток и их

метаболитов является способность изучать микробиологические объекты без их разрушения или изменения, т.е. *in situ*, в отличие от стандартных химических, биохимических или физических методов изучения, приводящих либо к разрушению структуры изучаемого образца, либо к изменению его нативного состояния. Однако метод пока мало распространен в экспериментах с изучением влияния на бактериальные культуры различных стрессов, что, в первую очередь, связано со сложностью в интерпретации получаемых результатов.

Таким образом, ИКФС является удобным инструментом не только для общего анализа, но и представляет большой потенциал для изучения конкретных изменений состава и структуры, происходящих в бактериальных клетках в ответ на различные стрессовые воздействия.

1.1.3 Пробоподготовка микробиологических образцов

В микробиологических исследованиях образцами для изучения методом ИКФС могут служить различные объекты, такие, как: культуры бактерий; отдельные клетки; выделенные биомакромолекулярные компоненты; включения; биопленки и др. Метод ИКФС дает результат в течение нескольких минут и применим ко всем микроорганизмам, культивируемым в лабораторных условиях. Тип исследуемого образца значительно влияет как на выбор варианта ИКФС, так и на выбор процесса пробоподготовки.

Поскольку наличие и соотношение всех био(макро)молекулярных компонентов клетки напрямую зависит от генома, ИК-спектр культуры микроорганизмов представляет собой специфический фенотипический и генетический отпечаток исследуемых клеток. Это дает возможность использовать ИКФС при дифференцировании бактерий вплоть до подвида или даже серогруппы [24, 56, 109].

Из используемых техник измерения ИК-спектров микробиологических объектов можно выделить три самые распространенные: 1) режим пропускания, 2) режим ДО и 3) режим НПВО. При использовании первых двух методов образцы

должны быть перенесены на специальный носитель (подложку) до проведения измерения [110]. Выбор подложки также зависит от используемого метода. Для получения качественных и воспроизводимых спектров необходим тщательный подбор подложки, на которой будет размещаться образец. Одним из самых важных условий для подложки является неспособность составляющего ее материала образовывать комплексы и связи с исследуемым образцом. Во всех случаях необходимо использовать водонепроницаемые и водоустойчивые материалы. Для измерений в режиме пропускания также должен использоваться материал, прозрачный в ИК-области, такой, как, например, ZnSe, BaF₂ или CaF₂ [36, 68, 77].

В микробиологических исследованиях микроорганизмы обычно культивируются до получения достаточного количества биомассы, необходимой для нанесения на подложку. Используемая для измерения биомасса может находиться как в полужидком состоянии (суспензия), так и в виде отдельных колоний, выделенных непосредственно с твердой питательной среды. Процесс измерения отдельных колоний менее трудоемкий по сравнению с таковыми для планктонных культур, поскольку не требует этапа очистки культуры от среды посредством центрифугирования [110].

В случае измерения предварительно высушенных образцов в режиме пропускания для получения полос на ИК-спектре с высоким соотношением сигнал/шум на подложку необходимо нанести однородную пленку образца с достаточной толщиной [66]. При нанесении на подложку слишком тонкого слоя образца соотношение сигнал/шум в спектрах образца снижается, что приводит к «зашумлению» спектра, т.е. относительно слабые сигналы исследуемого образца перекрываются сигналами от CO₂ и воды, находящихся в атмосфере. В случае нанесения большого количества образца формируется плотная, толстая пленка. Интенсивности сигналов от функциональных групп в таком образце (эквивалент оптической плотности) настолько сильны, что при измерении спектра полосы от отдельных компонентов сливаются между собой и принимают форму плато («перегруз образца»), что также исключает возможность правильной интерпретации полученных данных и их дальнейшего анализа. В случае образцов,

находящихся в жидком состоянии, для получения высокого соотношения сигнал/шум на спектрах необходимо корректно подбирать концентрацию биологического образца в растворе, что осуществляется индивидуально для каждого исследуемого образца.

Непосредственно перед измерением необходимо исключить поглощение воды веществом, что достигается высушиванием [110]. Для жидких образцов исключение сигналов растворителя из измеряемого ИК-спектра осуществляется предварительным измерением спектра сравнения растворителя (контроль) или же вычитанием из уже измеренного общего ИК-спектра исследуемого растворенного образца ИК-спектра растворителя при помощи программного обеспечения. Последнее требует стандартизации толщины измеряемого образца и с трудом применимо для концентрированных растворов.

Несмотря на распространенность метода ИКФС, не разработано общих методик пробоподготовки микробиологических образцов, что объясняется большим разнообразием объектов и их физическими состояниями.

Метод ИКФС используется во множестве областей науки и медицины, в том числе, все более активно – в микробиологии. В микробиологических исследованиях метод помогает при решении множества различных задач: в основном при идентификации и дифференциации различных видов или штаммов микроорганизмов; при изучении различных биомакромолекул, таких как белки или отдельные аминокислоты, полисахариды, липиды, ДНК, РНК и другие. Однако несмотря на множество плюсов при работе с методом ИКФС, весьма важным из которых является его способность давать информацию об исследуемом объекте *in situ*, т.е. в его нативном состоянии, метод гораздо реже используется для изучения сложных биологических систем, таких, как, например, бактериальная клетка или культура бактерий. Это можно объяснить недостаточной проработкой вопросов пробоподготовки, а также отсутствием точных протоколов анализа измеряемых ИК-спектров и, следовательно, возникающими в связи с этим трудностями при интерпретации результатов; отметим также наличие ошибок в публикациях.

1.2 Синтез полигидроксиалканоатов – стратегия выживания бактерий в стрессовых условиях

В естественных условиях обитания для адаптации к неблагоприятным условиям бактерии выработали разнообразные стратегии выживания. Так, в условиях с различной доступностью питательных веществ микроорганизмы накапливают запасующие соединения, такие, как гликоген, полифосфаты, или ПГА [14]. Способность микроорганизмов накапливать ПГА при росте увеличивает их выживаемость при неблагоприятных условиях. ПГА запасаются в виде цитоплазматических сферических включений – гранул, представляющих собой гидрофобное ядро, состоящее из аморфной фазы ПГА, окруженное ассоциированными с гранулами полимера белками. Эти белки включают ПГА-синтазу, ПГА-деполимеразы, регуляторные белки и структурные белки гранул ПГА [111]. Гранулы ПГА обычно синтезируются, когда источник углерода присутствует в избытке одновременно при недостатке других питательных веществ, необходимых для роста биомассы.

Помимо выполнения запасующей функции, ПГА также участвуют во многих других физиологических процессах, таких, как поддержание бескислородного фотосинтеза, участие в цикле серы в микробных матах, зависимых от фотосинтетической фиксации углерода [112, 113] и увеличение периода фиксации азота диазотрофами в темноте [114]. Среди биологических функций ПГА одной из важнейших является повышение выживаемости бактерий при действии различных стрессовых факторов.

Повышение устойчивости бактерий по отношению к различным стрессовым факторам в присутствии в клетках ПГА было продемонстрировано для многих видов бактерий. Увеличивалась выживаемость бактерий при экстремальных температурах [105–107], осмотическом и кислотном стрессе, УФ-облучении [104, 115], а также в присутствии этанола [116] и ТМ [28, 29].

С. Тал и И. Окон показали, что бактериальные клетки *A. brasilense*, накапливающие ПГА, гораздо более устойчивы к воздействию различных

стрессовых факторов по сравнению с клетками, содержащими малые количества этого биополимера [115]. Эти результаты были подтверждены в экспериментах по выживаемости в стрессовых условиях на мутантных штаммах *A. brasilense*. Было также изучено воздействие таких стрессовых условий, как УФ-излучение, высокая температура, осмотический шок и воздействие H_2O_2 [117–119].

На примере дикого штамма *Aeromonas hydrophila* и его мутанта было показано, что мутант по ПГА-синтазе, неспособный синтезировать ПГА, хуже выдерживает воздействие экстремальных температур, УФ-излучения, гиперосмотического шока и добавление в среду H_2O_2 или этанола [120].

Защитная роль ПГА была изучена на диком штамме *E. coli* и его рекомбинантных штаммах. Последние содержали только гены синтеза ПГА или же гены синтеза вместе с генами внутриклеточных ДНК-деполимераз. Было показано, что все рекомбинантные штаммы были более устойчивы к тепловому шоку, УФ-излучению, низким значениям pH и осмотическому давлению, чем дикий штамм *E. coli*, не способный к синтезу ПГА [121].

Некоторые бактерии оказались способны использовать токсичные вещества, такие как, например, метанол [122, 123] или стирол [124], в качестве субстрата для синтеза ПГА.

Синтез и деградация ПГА является одной из основных стратегий выживания в неблагоприятных внешних условиях для большого количества видов бактерий, благодаря чему они получают преимущество при воздействии широкого спектра различных экстремальных факторов среды.

1.2.1 Характеристика полигидроксиалканоатов

ПГА представляют собой полимеры гидроксипроизводных ЖК, которые продуцируются различными бактериями как внутриклеточный резервный материал по углероду и энергии и являются биосинтезирующимися, биоразлагаемыми и полностью перерабатываемыми полимерами [125, 126]. Эти сложные полиэфиры синтезируются многими грамположительными и

грамотрицательными бактериями, относящимися, по меньшей мере, к 75 различным родам, среди которых можно выделить до 300 видов бактерий [127].

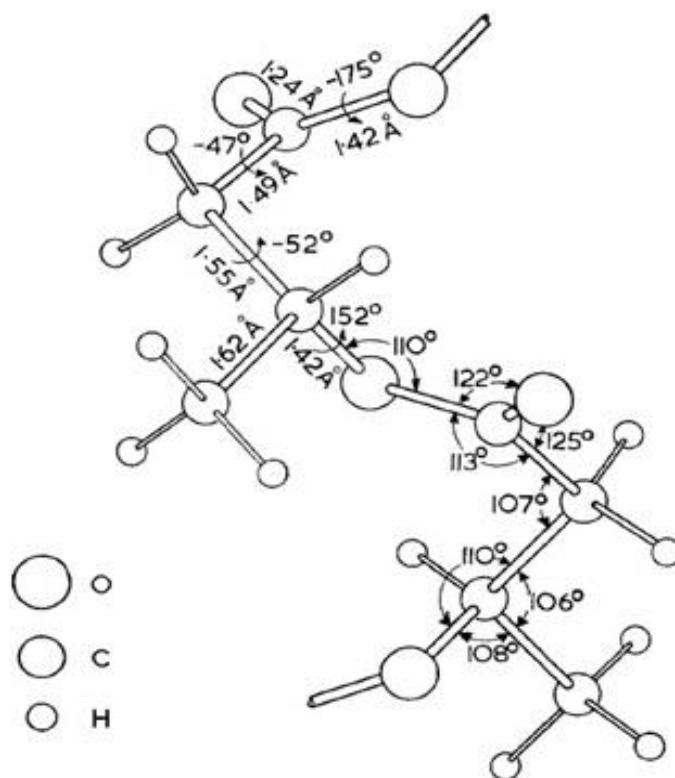
В зависимости от количества атомов углерода в мономере ПГА можно разделить на три основные категории: короткоцепочечные (кц-ПГА), содержащие 3–5 атомов углерода; среднецепочечные (сц-ПГА), содержащие 6–14 атомов углерода; длинноцепочечные ПГА (дц-ПГА), содержащие более 14 атомов углерода. Другой тип классификации разделяет ПГА на гомополимеры, т.е. содержащие только один тип мономерного звена, и гетерополимеры (сополимеры), которые состоят из мономерных звеньев нескольких типов. Соплимеры могут представлять собой комбинацию только короткоцепочечных мономеров или мономеров со средней длиной цепи, или состоять как из короткоцепочечных, так и из среднецепочечных мономеров ПГА [128].

Существуют ПГА с нестандартной химической структурой, включающей боковые цепи с неалкильными группами (например, ароматическое кольцо, фенильную группы, феноксигруппу, ненасыщенный углеводород, сложноэфирную группу, аллильную группу, цианогруппу, галогенированный углеводород, эпоксиды и тиоэфиры). Эти ПГА характеризуются разнообразными полезными свойствами и широко применяются в инженерии и медицине [129].

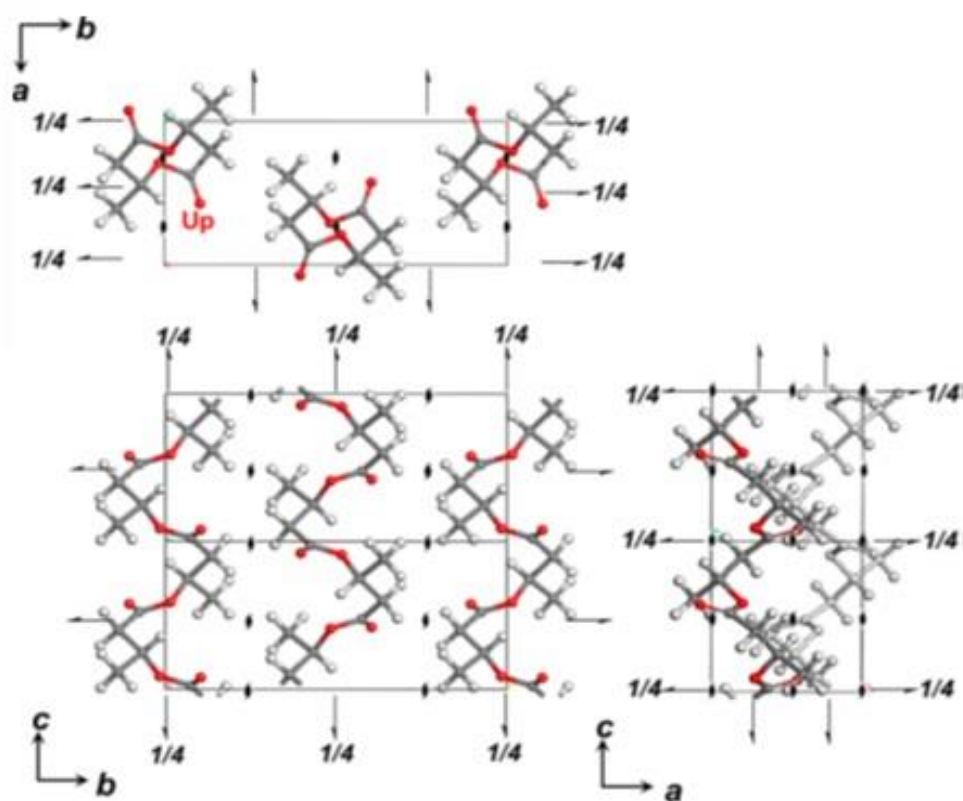
Одним из важнейших свойств ПГА, напрямую связанным с их физическими свойствами, является упорядоченность (кристалличность). Наиболее изученный представитель ПГА – ПГБ, – демонстрирует высокую степень упорядоченности, что физически выражается в жесткости и хрупкости этого полимера. Чтобы изменить степень упорядоченности и, следовательно, физические свойства ПГБ в сторону увеличения эластичности последнего, различные мономеры ПГА иногда сополимеризуют с ПГБ. Соплимеры на основе ПГБ демонстрируют широкий спектр физических свойств в зависимости от химической структуры сомономерных звеньев [130].

На Рисунке 5 показана молекулярная конформация ПГБ (А), а также его структура в упорядоченном состоянии (Б).

А



Б



А – молекулярная модель поли-3-гидроксибутирата [131];

Б – упорядоченная структура поли-3-гидроксибутирата [132]

Рисунок 5 – Структура поли-3-гидроксибутирата

Кристаллическая решетка ПГБ содержит две левозакрученные спирали молекулы ПГБ в антипараллельной ориентации [131, 133].

За последние десятилетия ПГА все более активно применяются в качестве промышленных пластмасс, медицинских имплантатов, печатных и фотографических материалов, пищевых добавок и лекарств [134, 135]. ПГА также нашли применение в качестве нового типа биотоплива [136]. В работе Д. Чжана с соавт. была продемонстрирована возможность применения генов ПГА при регулировании метаболизма гиалуроновой кислоты бактериями вида *Streptococcus zooepidemicus* [137]. Области применения ПГА все продолжают расширяться.

Поскольку ПГА обладают широким спектром разнообразных полезных свойств, способны разлагаться не только под воздействием химических и физических факторов, но и в результате метаболизма микроорганизмов, они представляют коммерческий интерес в качестве экологически чистых биопластиков, выступающих в качестве альтернативы традиционным полимерам.

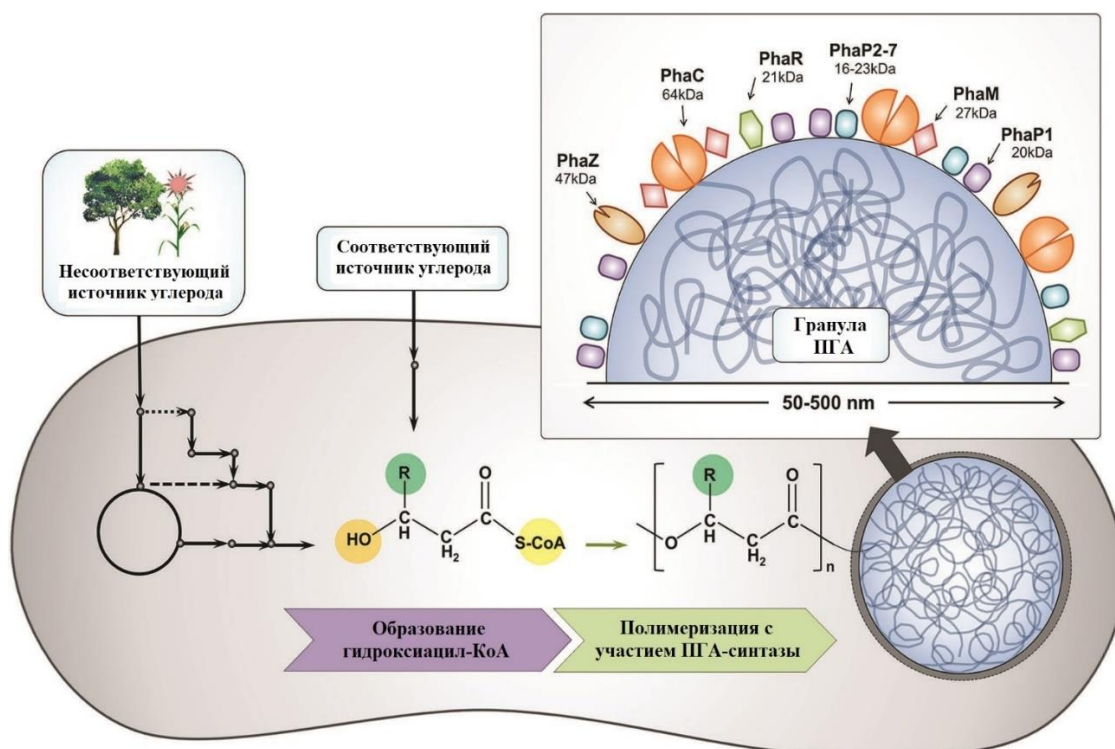
1.2.2 Метаболический путь синтеза поли-3-гидроксибутирата

Пути биосинтеза ПГА прямо или косвенно связаны со многими основными метаболическими путями, включая гликолитические и пентозофосфатные пути, цикл Кребса, пути биосинтеза и деградации аминокислот и ЖК [138], и были детально исследованы у различных микроорганизмов [139–141].

Значительные успехи были достигнуты в изучении ферментов метаболизма ПГА. Были идентифицированы и охарактеризованы на молекулярном уровне гены, кодирующие ферменты полимеризации (ПГА-синтазы), ферменты метаболизма и вспомогательные белки, участвующие в биосинтезе ПГА у различных бактерий, что привело к лучшему пониманию процессов биосинтеза и деградации ПГА [142–149].

В клетках бактерий ПГА существуют в виде цитоплазматических включений, окруженных различными белками, ассоциированными с этими гранулами (Рисунок б), которые вовлечены в процессы биосинтеза, деградации, иницирования синтеза

и стабилизации ПГА. К ним относятся: ПГА-синтаза (PhaC), которая полимеризует гидроксиацил-КоА в ПГА, ПГА-деполимераза (PhaZ), ПГА-олигомер гидролаза (PhaY), которая разрушает ПГА [150, 151], фазины (PhaP, PhaI, PhaF, ApdA, GA14 и Mms16) [152–157], регуляторные белки (PhaR и PhaQ) [150, 158] и белок, активирующий ПГА-синтазу (PhaM) [159]. Схематичная модель биосинтеза ПГА представлена на Рисунке 6.



PhaC – ПГА-синтаза, PhaZ – ПГА-деполимераза), PhaP1-7 – фазины, PhaP1 – наиболее часто встречающийся белок, PhaR – регуляторный белок, PhaM – белок, активирующий ПГА-синтазу,

R – алкильная группа, имеет структуру C_nH_{2n}

Рисунок 6 – Схематичное изображение биосинтеза ПГА. Гранула ПГА типичного штамма-производителя, *Cupriavidus necator*, с ассоциированными ферментами и белками [160]

ПГА-синтаза является ключевым ферментом, ответственным за сам процесс поликонденсации, влияет на состав мономера, молекулярную массу и количество продуцируемого ПГА [161]. Она позволяет использовать широкий спектр субстратов для синтеза различных полимеров, при этом обладает

стереоспецифичностью, взаимодействуя только с мономерами (R) конфигурации [148, 161].

ПГА-синтазы могут быть классифицированы на 4 разных класса согласно конфигурации ферментных субъединиц и предпочитаемой длине углеводородной цепи субстратов. ПГА-синтазы I, III и IV класса используют короткоцепочечные мономеры (C3–C5), II класса – среднецепочечные мономеры (C6–C14) [148, 162–165].

Некоторые ПГА-синтазы обладают способностью использовать в качестве субстратов как короткоцепочечные, так и среднецепочечные гидроксиацил-КоА. Такие ПГА-синтазы найдены у некоторых видов бактерий, например, *Thiocapsa pfennigii*, *A. caviae* и у некоторых видов бактерий рода *Pseudomonas* [166–169].

Биосинтез ПГА можно разделить на два этапа: (1) образование гидроксиацил-КоА через соответствующий путь метаболизма из субстрата-предшественника или из несоответствующего источника углерода и (2) полимеризацию гидроксиацил-КоА до ПГА с участием ПГА-синтазы (Рисунок 6).

Хотя существует более 150 мономеров, образующих ПГА, для синтеза большинства из них требуется добавление соответствующих предшественников в качестве субстрата ввиду отсутствия путей биосинтеза предшественников из альтернативных источников углерода.

Предшественники ПГА обладают сходными молекулярными структурами с конечными мономерами и преобразуются в соответствующие гидроксиацил-КоА посредством простых биохимических реакций. Некоторые мономеры могут синтезироваться *in vivo* из несоответствующих источников углерода через нативные пути метаболизма (например, через гликолиз, цикл трикарбоновых кислот, биосинтез и распад ЖК, биосинтез аминокислот и цикл Кальвина) или через искусственно созданные биосинтетические пути метаболизма [160]. На сегодняшний день считается, что у бактерий имеется восемь различных путей метаболизма ПГА [129].

Путь метаболизма, представленный на Рисунке 7, является путем синтеза ПГБ. Он включает три фермента: ПГА-синтазу (PhbC), β -кетотиолазу (PhbA) и редуктазу (PhbB), кодируемые опероном *phbCAB*.

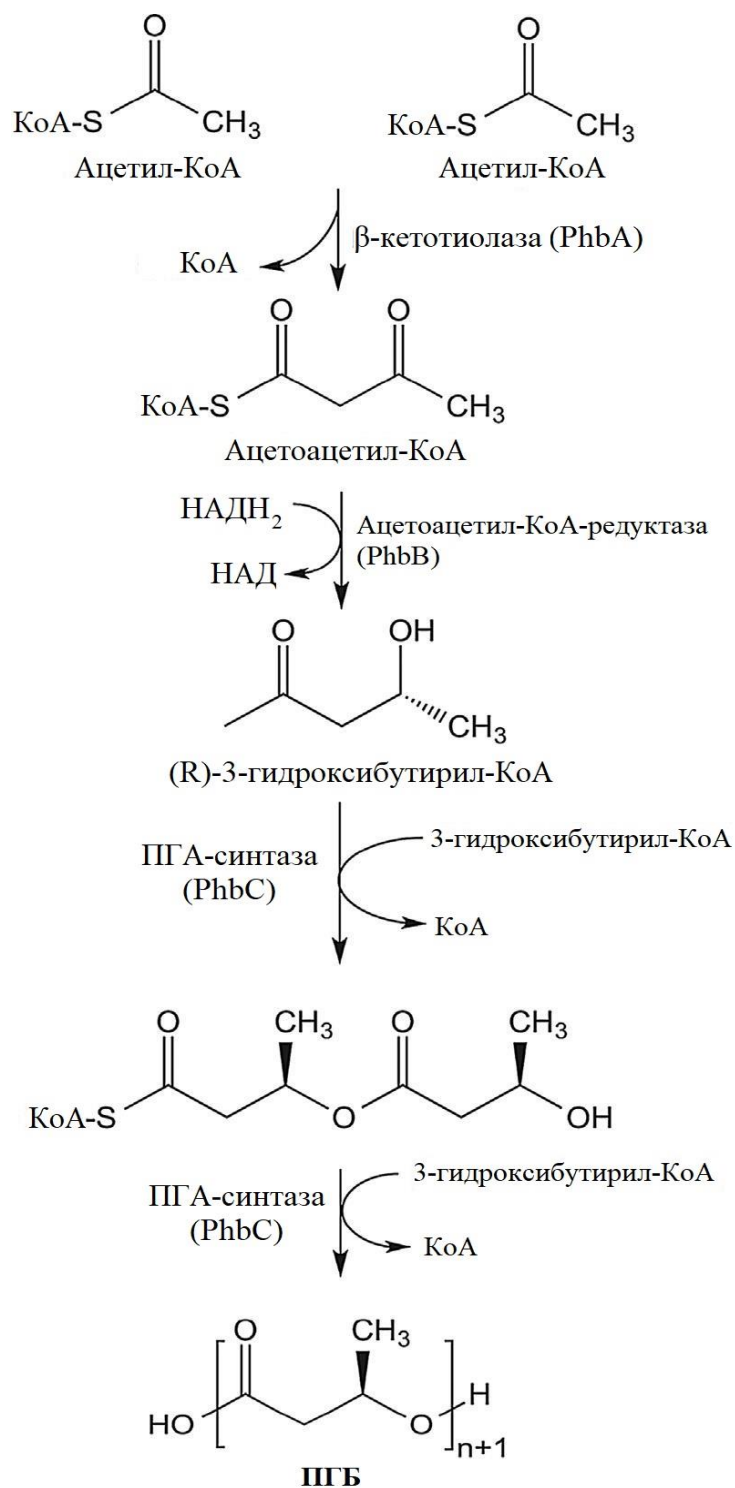


Рисунок 7 – Путь биосинтеза ПГБ из ацетил-КоА у *Ralstonia eutropha* (также известный как *Cupriavidus necator*) [129]

При низком соотношении C:N, т.е. когда соединения азота присутствуют в достаточных количествах, соотношение НАДФН/НАДФ уменьшается и ацетил-КоА идет в цикл трикарбоновых кислот, освобождая КоА для следующего цикла. Накопление КоА ингибирует активность β -кетотиолазы, блокируя цикл синтеза ПГА, поскольку β -кетотиолаза является первым ферментом в биосинтетическом пути ПГА.

С другой стороны, продукция ПГА увеличивается, когда рост клеток снижается при ограничении содержания соединений азота в среде. Соотношение НАДФН/НАДФ увеличивается, что ингибирует активность цитрат-синтазы и изоцитратдегидрогеназы, в результате чего блокируется цикл трикарбоновых кислот. Это приводит к высокой концентрации ацетил-КоА и снижению количества КоА, в результате чего активируется фермент β -кетотиолаза [170, 171]. Таким образом, в первом пути, ацетил-КоА, полученный путем гликолиза сахара или другого субстрата, полимеризуется β -кетотиолазой (PhbA) в ацетоацетил-КоА, а затем превращается в (R)-3-гидроксibuтирил-КоА. Последняя стадия представляет собой НАДФН-зависимую реакцию, катализируемую ацетоацетил-КоА-редуктазой (PhbB). Это преобразование является стереоспецифической реакцией, дающей мономер (R)-3-гидроксibuтирил-КоА, который в дальнейшем будет полимеризоваться с помощью ПГБ-синтазы (PhbC) с образованием ПГБ. Основным ограничением этого пути является его способность производить только короткоцепочечные ПГА [129, 160, 172–174].

Второй и третий пути синтезируют ПГА со средней длиной цепи. Во втором пути синтеза ПГА получение предшественников для синтеза мономеров идет через β -окисление ЖК. Путь IV использует НАДФН-зависимую ацетоацетил-КоА-редуктазу для окисления (S)-(+)-3-гидроксibuтирил-КоА.

Другие пути используются для синтеза альтернативных сополимеров [129].

Можно заключить, что на данный момент достаточно подробно изучены пути метаболизма различных ПГА, в частности, ПГБ, а также основные белки-ферменты и регуляторные белки, участвующие в метаболизме ПГА.

1.2.3 Прикладное значение полигидроксиалканоатов

К одной из глобальных экологических проблем на планете относится загрязнение окружающей среды отходами из неразрушаемых синтетических пластиков, накапливающихся в природной среде и наносящих огромный ущерб флоре и фауне. Замена таких пластиков на биоразлагаемые аналоги в промышленности диктует поиск и разработку экологически чистых и сходных по физико-химическим свойствам биопластиков и является важным и актуальным направлением в биотехнологии и микробиологии.

ПГА обладают разнообразными полезными свойствами, такими, как биоразлагаемость, термопластичность, биосовместимость, нетоксичность, вследствие чего они все чаще применяются в промышленности как альтернатива химически синтезируемым из нефти полимерам. Они продуцируются многими микроорганизмами, относящимися, например, к родам *Pseudomonas*, *Caulobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Rhizobium* и др. Суперпродуцентом, накапливающим до ~80% от сухой биомассы и наиболее широко используемым в промышленности для производства ПГА, является вид *Ralstonia eutropha* (также известный как *Alcaligenes eutrophus*, *Wautersia eutropha* и *Cupriavidus necator*) [175–178].

На сегодняшний день конечная стоимость ПГА выше по сравнению с классическими пластиками, несмотря на большое количество и разнообразие бактерий-продуцентов [170]. Это объясняется высокой стоимостью субстратов, а также используемых растворителей при экстракции и очистке биополимеров. За последние годы использование таких дешевых субстратов, как меласса, молочная сыворотка, различные углеводы, метанол, этанол, уксусная кислота и др., позволило значительно снизить стоимость конечного продукта [170, 175]. Недостатком при производстве ПГА остается нестабильность молекулярных масс и структур у получаемых полимеров, приводя к колебанию термомеханических свойств [179, 180].

Одним из перспективных направлений является создание рекомбинантных штаммов, синтезирующих на основе дешевых субстратов большие количества ПГА

с более устойчивыми молекулярными массами [144, 170]. Помимо этого, штаммы, способные к более интенсивному синтезу ПГА, обладают повышенной устойчивостью к различным неблагоприятным внешним факторам, что важно при использовании фитостимулирующих ризобактерий в агробиотехнологии.

В зависимости от используемого бактериального штамма и особенно от ПГА-синтазы, продуцируемой конкретным штаммом, ПГА могут синтезироваться в виде гомополимеров, сополимеров или их смеси. К настоящему времени определено более 150 различных структур мономеров ПГА [144, 160]. В некоторых случаях такие функциональные группы как бензол, галогены, эпоксиды и циклические молекулы, могут становиться частью этих мономерных структур [181].

Наиболее изученным полимером, относящимся к кц-ПГА, является ПГБ – гомополимер 3-гидроксимасляной кислоты. Он характеризуется жесткостью и хрупкостью, тяжело обрабатывается из-за своей кристаллической структуры. Введение 3-гидроксивалерата в ПГБ приводит к получению сополимера поли-3-гидроксibuтирата-3-гидроксивалерата. Последний является материалом более гибким и устойчивым к термальным воздействиям [182]. Сополимеры кц-ПГА используются в основном для производства одноразовых предметов и упаковочных материалов для пищевых продуктов. Среднецепочечные ПГА, характеризующиеся высокой эластичностью, используются как хирургические швы, имплантаты, биоразлагаемые матрицы для доставки лекарственных средств и т.д. [175].

Также в промышленности используются: поли-4-гидроксibuтират, сополимеры 3-гидроксibuтирата, 3-гидроксигексаноата, поли-3-гидроксиоктаноата и др. Основными промышленными компаниями, ведущими научные исследования в этой области, являются: Biomatera (Канада), Biomer (Германия), Bio-On Srl. (Италия), BluePHA (Китай), Danimer Scientific (США), Kaneka Corporation (Япония), и многие другие [175].

К ключевым свойствам ПГА относится их способность разлагаться в течение короткого периода времени, что делает их особенно перспективными материалами

в биомедицине. Огромным потенциалом для применения в тканевой инженерии, разработке продукции для медицинской и терапевтических областей обладают наиболее изученные представители ПГА – ПГБ и его сополимер поли-3-гидроксibuтират-3-гидроксивалерат. Он применяется при изготовлении сердечно-сосудистых имплантатов (сердечных клапанов, стентов, сосудистых трансплантатов) [183], в сосудистой инженерии [184, 185], костной [186, 187] и хрящевой тканях [188, 189], ткани нервных каналов [190], а также матрицы носителей для доставки лекарств (таблетки, терапия с использованием микроносителей) [191]. Для имплантатов, созданных из ПГА, показано, что при длительной имплантации они не вызывают развития канцерогенеза [192]. Для улучшения свойств и соответствия биологическим свойствам тканей человека ПГА смешивают с гидроксиапатитом и такими полимерами, как желатин, шелк, коллаген [193]. В работе К. Рут с соавт. показано, что чистый среднецепочечный гомополимер, поли-3-гидроксibuтират, обладает антимикробной активностью [194]. Кроме того, К. Фаву с соавт. показали, что 3-гидроксигексановую кислоту можно использовать в качестве промежуточного продукта для синтеза аналогов лаулималида, который является противораковым веществом [195].

Для бактерий вида *Pseudomonas entomophila* был сконструирован метаболический путь синтеза среднецепочечных ПГА [196]. Метаболический путь создавался путем частичного удаления пути β -окисления и удаления оперона *phaC* ПГА-синтазы, что сопровождалось сверхэкспрессией гена *tesB*. Данный ген кодирует тиоэстеразу, фермент, участвующий в β -окислении и катализирующий реакцию синтеза ЖК из ацил-КоА. Бактерии вида *P. entomophila* становились способны к продуцированию 3-гидроксидекановой, 3-гидроксидодекановой и 3-гидрокситетрадекановой кислот из соответствующих ЖК.

Таким образом, возможность варьировать процессы синтеза и получения полимеров и сополимеров с различным мономерным составом вкпе с экономической выгодой делает промышленное производство и использование ПГА перспективным и выгодным направлением в промышленности.

1.3 Характеристика бактерий рода *Azospirillum*

Род *Azospirillum* включает в себя свободно живущие бактерии, многие из которых способствуют росту и развитию растений (plant-growth-promoting bacteria, PGPB). Род *Azospirillum* относится к классу альфапротеобактерий и включает в себя бактерии, имеющие вибриоидную или спиральную форму, с полярными и латеральными жгутиками [16]. Представители азоспирилл обитают в основном в ризосфере и колонизируют корни высших растений, однако, обладая широкой адаптивной способностью, могут занимать разнообразные экологические ниши.

Изначально род *Azospirillum* включал два вида, названные *A. brasilense* и *A. lipoferum* [197]. В последующие десятилетия были выделены и описаны следующие виды: *A. halopraeferens* [198], *A. doebereinerae* [199], *A. largomobile* [200], *A. oryzae* [201], *A. melinis* [202], *A. canadense* и *A. zeaе* [203, 204], *A. rugosum* [205], *A. picis* [206], *A. thiophilum* [207], *A. formosense* [208], *A. humicireducens* [209], *A. fermentarium* [210], *A. soli* [211] и *A. agricola* [212].

Совсем недавно было обнаружено и описано еще 4 вида бактерий рода *Azospirillum*, из них только один вид был выделен из ризосферы: в 2020 г. из почвы, взятой из горячего источника (провинция Юньнань, КНР), была выделена бактерия вида *A. thermophilum* [213]. Другие недавно обнаруженные три вида занимали отличную от ризосферы природную нишу. В 2019 году бактерия вида *A. ramasamyi* была выделена из органических удобрений, состоящих из ферментированных продуктов жизнедеятельности крупного рогатого скота [214]. В том же году Е. Тихонова с соавт. выделили новый вид *A. palustre* из кислого торфяника у верхового болота Усвятский Мох (Западно-Двинская опытная станция Института лесоводства РАН, Тверская область, Россия) [215]. Из вод озера Байян (район Сюнган, Китай) был выделен вид *A. griseum* [216].

За последние несколько лет были переклассифицированы два вида: *A. irakense* и *A. amazonense* в *Niveispirillum irakense* и *Nitrospirillum amazonense*, соответственно [217]. Штамм *A. brasilense* Sp245 был также переклассифицирован

в новый вид *A. baldaniorum* Sp245 [108]. Таким образом, на данный момент в роду бактерий рода *Azospirillum* насчитывается более 20 видов.

Азоспириллы являются одними из самых широко изучаемых и коммерчески используемых фитостимулирующих ризобактерий. Положительные результаты были получены при применении на различных культурах растений инокулянтов азоспирилл, входящих в состав нескольких коммерческих препаратов [218–221]. Первый коммерческий препарат, содержащий азоспириллы, был выпущен в 2009 г, и за последнее время бактерии данного рода все более активно применяются в агробиотехнологии при выращивании различных культур [19, 222].

Широкое применение азоспирилл объясняется большим количеством полезных свойств, оказывающих положительное влияние на рост и развитие растений. Хотя наиболее распространенным свойством является их способность фиксировать N_2 , все большее количество публикаций описывает другие свойства, ответственные за стимуляцию роста и развития растений. Одним из основных свойств азоспирилл является способность синтезировать фитогормоны, включая ауксины [223], такие, как индолил-3-уксусная кислота, улучшающая рост корней, адсорбцию ими воды и минералов [219, 224, 225], цитокинины [226], гиббереллины [227], абсцизовую кислоту [228], этилен [229] и салициловую кислоту [230]. Фитогормоны значительно влияют на рост корней, вызывая улучшение поглощения влаги и питательных веществ [198]. Некоторые штаммы азоспирилл могут растворять неорганический фосфор, делая его более доступным для растений, что приводит к увеличению урожайности [231]. Бактерии рода *Azospirillum* увеличивают выживаемость растений при различных абиотических стрессах, таких как засоление и засуха [232–234], путем активации индуцированной системы толерантности [235]. Эта система отвечает за устойчивость растений к абиотическим стрессам, включая в себя антиоксидантную защиту, осмотическую регулировку, продукцию фитогормонов и другие защитные стратегии, такие как экспрессия PR-генов (pathogenesis-related genes) [225].

Другая важная особенность азоспирилл связана с их способностью к биологическому контролю патогенов растений [236–238]. Это обеспечивается

синтезом сидерофоров, ограничивающих доступность железа (Fe) для фитопатогенов [238], или же изменением метаболизма растения-хозяина, в ходе которого включается синтез различных вторичных метаболитов, повышающих устойчивость растений к патогенам. Данный механизм известен как индукция системной резистентности [239]. Механизмы, используемые фитостимулирующими ризобактериями для повышения выживаемости растения-хозяина при воздействии биотических и абиотических стрессов, могут отличаться для разных видов и сортов растений, бактериальных видов и штаммов, а также зависят от фитопатогена и интенсивности стресса [225].

Учитывая роль азоспирилл при повышении устойчивости растений к воздействию различных стрессовых факторов и возможности использования этих ростстимулирующих ризобактерий в сельском хозяйстве, важным является изучение выживания бактерий в неблагоприятных условиях.

1.3.1 Биопленки как форма существования бактерий рода *Azospirillum* в естественных условиях

На сегодняшний день известно, что около 95–99% микроорганизмов существуют в природных местах обитания в виде биопленок [240]. Биопленки – это устойчивые, пространственно и метаболически структурированные сообщества микроорганизмов, заключенные в образуемый ими внеклеточный сложный биополимерный матрикс, которые обычно локализуются на границе раздела фаз.

Формирование биопленок происходит в несколько этапов. На первом этапе планктонные клетки (первичные колонизаторы) мигрируют к поверхности раздела фаз с дальнейшим образованием микроколоний и продукцией внеклеточного полимерного матрикса. За счет размножения клеток первичных колонизаторов формируется трехмерная структура биопленки, к которой прикрепляются микроорганизмы – вторичные колонизаторы, что приводит к образованию зрелой биопленки. Первичными и вторичными колонизаторами могут выступать клетки как одного вида, так и нескольких различных видов бактерий. По мере старения и

исчерпания источников углерода и энергии биопленка претерпевает дезинтеграцию (или дисперсию), в результате которой бактерии переходят к планктонному образу жизни и поиску новых местообитаний [241, 242].

Естественной средой обитания для большинства представителей бактерий рода *Azospirillum* является почва, где эти бактерии колонизируют корни растений, существуя на них в основном в виде сложных биопленок.

Методом флуоресцентной гибридизации *in situ* для бактерий вида *A. brasilense*, выращенных на корнях пшеницы в почве, показано, что вид образует микроколонии или агрегаты, предпочтительно колонизируя корневые волоски и зоны удлинения. Клетки также наблюдались внутри корневых волосков и в некоторых межклеточных пространствах корня [15]. Одним из механизмов, посредством которого бактерии регулируют переход между планктонной культурой и прикрепленным состоянием клеток, является контроль внутриклеточного уровня вторичного мессенджера – циклического дигуанилатмонофосфата [243]. Его участие в процессе формирования биопленки было показано для штамма *A. brasilense* Sp7. Мутация в гене *cdgA* (ген, кодирующий дигуанилатциклазу A) у этого штамма приводила к заметному снижению интенсивности в формировании биопленки – масса зрелой биопленки была на 59% ниже, чем у таковой в случае дикого штамма; также происходило формирование более тонких биопленок (28 мкм для дикого штамма и 19 мкм для мутанта на 3 сут роста) [244].

Бактерии могут изменять свой способ существования от планктонных к прикрепленным культурам, с образованием биопленок, воспринимая различные сигналы и изменения в окружающей среде [245]. Показано, что мутант родительского штамма *A. brasilense* Sp245 по нитратредуктазе, влияющей на продукцию NO, формировал биопленки почти в два раза менее интенсивно [246]. Оксид азота (NO) – это сигнальная молекула, участвующая во многих процессах у бактерий, включая образование или дисперсию биопленок. Дальнейшее добавление к штамму-мутанту экзогенного донора NO приводило к усилению

интенсивности образования им биопленки, что доказывало влияние NO на процессы формирования биопленок.

При колонизации корней бактериями рода *Azospirillum* важную роль также играет подвижность и хемотаксис. Механизм хемотаксиса по отношению к органическим кислотам, некоторым аминокислотам и корневым экссудатам сопряжен с процессами колонизации корней растений бактериями рода *Azospirillum* [247]. Первоначальное прикрепление азоспирилл к корням также зависит от участия полярного жгутика, который позволяет бактериям адсорбироваться на поверхности корней [248–250]. У мутантов *A. brasilense*, утративших филамент полярного жгутика, снижается способность к адсорбции на корнях пшеницы [251]. Считается, что гликозилированный полярный жгутик при формировании биопленки действует непосредственно как адгезин корня [249].

В процессах агрегации азоспирилл на поверхности корня также участвуют экстраклеточные полисахариды, являющиеся одними из основных компонентов внеклеточного полимерного матрикса биопленок. Для мутанта штамма *A. brasilense* Sp7 по гену гликогенфосфорилазы (участвующей в процессе расщепления запасаемого гликогена) было показано, что он обладает измененным экзополисахаридным составом и ослабленной способностью образовывать биопленки по сравнению с диким штаммом [252].

Взаимодействие между растительными и бактериальными полисахаридами и лектинами, возможно, включая белки бактериальной наружной мембраны, является частью процесса бактериальной агрегации и прикрепления [253–256]. Показано, что спонтанные или индуцированные изменения состава и (или) структуры плазмид штамма *A. brasilense* Sp245, приводящие к дефектам в синтезе липополисахаридов и экстраклеточных полисахаридов, связывающих прижизненный краситель калькофлуор, оказывают заметное влияние на эффективность формирования биопленок азоспирилл на абиотических поверхностях. Так, мутанты, не способные к синтезу экстраклеточных полисахаридов, менее интенсивно формировали биопленки [257]. Шелудько соавт. исследовали роль биополимеров матрикса биопленок *A. brasilense* Sp245

[258]. Установлено, что полисахариды, связывающие калькофлуор, и комплексы, содержащие липополисахариды и белковые структуры, фиксировали зрелые биопленки на твердой поверхности и выполняли каркасную функцию. Углеводный гаптен, входящий в состав матрикса зрелой биопленки, обладал специфическим сродством к агглютинирующему зародышей пшеницы (АЗП), что доказало его важную роль при ассоциативном взаимодействии и колонизации корневой системы растений.

Для дикого штамма *A. brasilense* Sp245 и его мутанта *A. brasilense* Sp245.1610, имеющего мутацию в генах липидного обмена – по гену *fabG1* предполагаемой 3-оксоацил-[ацилпереносащий белок]-редуктазы, было показано, что мутант образовывал биопленки с меньшей биомассой, а также отличался липополисахаридным составом [259]. В работе Шелудько с соавт. на примере бактерий штаммов *A. brasilense* Sp7, Cd и Sp245 показана их бóльшая устойчивость к высушиванию и окислительному стрессу в виде биопленок по сравнению с планктонными культурами этих же штаммов [260].

Бактерии рода *Azospirillum*, как представители фитостимулирующих ризобактерий, представляют собой большой интерес для изучения. Важна информация об их структуре, составе и процессах формирования биопленок.

1.3.2 Синтез поли-3-гидроксибутирата бактериями рода *Azospirillum* в стрессовых условиях

Бактерии рода *Azospirillum* относятся к микроорганизмам, способным к синтезу и накоплению ПГА. Для вида *A. brasilense* известно, что он накапливает ПГА исключительно в виде ПГБ [261]. Показано, что отношение C:N в среде является основным фактором, управляющим синтезом ПГА у *Azospirillum* [14]. Оптимальным соотношением, при котором азоспириллы способны синтезировать ПГА, считается C:N~20 [199]. Известно, что при соответствующих условиях клетки бактерий вида *A. brasilense* могут накапливать ПГБ до 75% от сухой биомассы [219].

Обнаружено, что у *A. brasilense*, содержащей большие количества ПГА, увеличивается выживаемость в условиях голодания [14]. Кроме того, было показано, что выживаемость мутантов *A. brasilense*, дефектных по продукции или деградации ПГА, ниже, чем у дикого типа. По сравнению с исходным штаммом, мутанты *A. brasilense* по генам *phaC* и *phaZ* (ПГА-деполимераза) были значительно менее устойчивы к действию таких неблагоприятных внешних условий, как УФ-облучение, осмотический шок, влияние высокой температуры, высушивание, окислительный стресс [117].

Запас ПГА у *A. brasilense* может поддерживать размножение клеток в отсутствие экзогенного источника углерода [117]. Кроме того, ПГА как единственный источник энергии способен поддерживать нитрогеназную активность и аэротаксис – два физиологических процесса, являющихся чрезвычайно энергоемкими [115].

Известно, что азоспириллы не способны образовывать споры. Однако при лишении питательных веществ или обезвоживании азоспириллы дифференцируются от вегетативной клетки в неподвижную спящую сферическую цисту. На примере бактерий штаммов *A. brasilense* Sp7 и Sp245 были продемонстрированы различия в образовании цистоподобных клеток – для штамма Sp7 было показано, что цистоподобные клетки формировались в условиях пятикратного снижения содержания азота в среде, в то время как штамм Sp245 образовывал цистоподобные клетки лишь в условиях дефицита фосфора [262]. В работе Шелудько с соавт. зафиксировано образование цистоподобных форм у бактерий штаммов *A. brasilense* Sp7, Cd и Sp245, культивировавшихся на среде без азота, и остававшихся жизнеспособными после 4 мес хранения в сухом состоянии [260]. Покоящиеся формы штамма *A. brasilense* Sp245 были более чувствительны к негативному воздействию H_2O_2 по сравнению с остальными штаммами. Известно, что цистоподобные клетки азоспирилл способны накапливать гранулы ПГБ, что также увеличивает их устойчивость к неблагоприятным факторам внешней среды [263].

Активно изучаются биосинтез, накопление в клетках и изменение состояния ПГБ у бактерий вида *A. brasilense* с применением ИКФС [12, 18, 26, 27, 98]. Было показано, что скорость накопления ПГБ и его состояние существенно зависит от условий – различных факторов, включая стрессовые, и их сочетания [17, 18, 27]. При изучении синтеза ПГБ были исследованы штаммы, занимающие различные экологические ниши: штамм Sp7 – эпифит, т.е. колонизирующий только поверхность, и штамм Sp245 – эндофит, способный проникать внутрь корня. Было показано, что даже на богатой питательной среде (с оптимальным соотношением C:N) присутствие различных ТМ: Co, Cu, Zn и Cd, индуцирует накопление ПГБ клетками штамма *A. brasilense* Sp7. На ИК-спектрах появлялась характерная для сложных эфиров интенсивная полоса поглощения при 1727 см^{-1} , отвечающая валентным колебаниям карбонильной группы, которая в спектре контрольных клеток проявлялась лишь в виде плеча. Были отмечены и другие изменения на спектрах, свидетельствующие о накоплении сложного полиэфира клетками штамма Sp7 в ответ на стресс, вызванный ТМ. Для штамма-эндофита Sp245 накопление ПГБ под влиянием ТМ не было зафиксировано [27].

Обнаружение индуцированного ТМ накопления ПГБ клетками неэндофита *A. brasilense* Sp7 может свидетельствовать о его лучшей адаптации к данному виду стресса по сравнению со штаммом-эндофитом Sp245. Известно, что синтез ПГБ индуцируется в определенных стрессовых условиях и увеличивает способность азоспириллы, в том числе штаммов *A. brasilense* Sp7 и Sp245, к выживанию [14, 199].

Различия в отклике эндофитного (Sp245) и неэндофитного штамма (Sp7) на стресс, вызванный ТМ, связаны, скорее всего, с их различными адаптационными способностями, что, очевидно, напрямую связано с занимаемыми данными штаммами различными экологическими нишами и может свидетельствовать о наличии у них различных механизмов устойчивости к ТМ. Полученные недавно данные о переклассификации штамма *A. brasilense* Sp245 в *A. baldaniorum* Sp245 [108] согласуются со сделанными выше выводами и также объясняют значительные различия в отклике на стресс, вызванный добавлением ТМ.

Таким образом, бактерии рода *Azospirillum* на данный момент активно изучаются [19]. Имеется множество данных об их роли в стимуляции роста и развития растений, исследуются механизмы формирования биопленок и биомакромолекулы, участвующие при их образовании. Учитывая возможность использования азоспирилл в сельском хозяйстве, не менее важным вопросом для изучения являются и механизмы устойчивости данных бактерий к различным стрессовым факторам. Исследуются механизмы и условия для синтеза ПГБ данными бактериями с применением метода ИКФС, позволяющим проследивать отличия в отклике на различные стрессы у штаммов азоспирилл, не разрушая целостности их клеток, т.е. *in situ*.

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Объекты исследования

Использованные в работе бактерии были получены из Коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (WDCM 1021, www.collection.ibppm.ru). Информация об используемых штаммах азоспирилл приведена в Таблице 5.

Таблица 5 – Штаммы *A. brasilense* и *A. baldaniorum*, использованные в работе

Штамм	Характеристика	Ссылка
<i>A. baldaniorum</i> (ранее известен как <i>A. brasilense</i> Sp245)	Пшеница (<i>Triticum aestivum</i>)	[108, 264]
<i>A. brasilense</i> Sp7 (ATCC 29145)	Росичка простертая (лежачая) (<i>Digitaria decumbens</i>)	[197]
<i>A. brasilense</i> Cd	Свиной палец (пальчатый) (<i>Cynodon dactylon</i>)	[197]
<i>A. baldaniorum</i> Sp245.1610	Неподвижный мутант Fla ⁻ Laf ⁻ , имеет вставку Omegon-Km в гене липидного метаболизма <i>fabG1</i> в плазмиде AZOBR_p1	[265]
<i>A. baldaniorum</i> Sp245.1610 (pRK415)	Несет в себе вставку вектора pRK415	[265]
<i>A. baldaniorum</i> Sp245.1610 (pRK415-p1160043)	Имеет вставку вектора pRK415 с клонированным геном <i>fabG1</i> , предположительно кодирующим 3-оксоацил-[ацилпереносящий белок]-редуктазу	[265]
<i>A. baldaniorum</i> Sp245.1610 (pRK415-p1160044)	Имеет вставку вектора pRK415 с клонированным геном <i>fabH1</i> , предположительно кодирующим 3-оксоацил-[ацилпереносящий белок]-синтазу	[265]
<i>A. baldaniorum</i> Sp245.1610 (pRK415-p1160043-44)	Имеет вставку вектора pRK415 с двумя клонированными генами – <i>fabG1</i> – <i>fabH1</i>	[265]

Штаммы поддерживались в коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН. Мутант Sp245.1610 и его комплементированные производные получены и предоставлены сотрудниками лаборатории генетики микроорганизмов ИБФРМ РАН.

2.2 Среда для культивирования бактерий

Культуры для всех экспериментов выращивали на синтетической малатной среде (СМС), предложенной Доберейнер и Дей [266], модифицированной до следующего состава (г/л):

K_2HPO_4	3,0;
KH_2PO_4	2,0;
NaCl	0,1;
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2;
$CaCl_2$	0,02;
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,02;
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,002;
Яблочная кислота	3,76;
NaOH	2,24;
Дрожжевой экстракт	0,1;

При помощи 1 М раствора NaOH реакцию среды довели до pH 6,8–7,0 перед автоклавированием. Среду стерилизовали в течение 30 мин при 121°C.

Соли $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ и $CaCl_2$ были приготовлены в виде стоковых 500-кратных стерильных растворов, которые добавлялись в среду культивирования после автоклавирования последней. Железо в среду вносили в хелатной форме из расчета 10 мл раствора на литр среды перед автоклавированием.

Раствор хелатного железа содержал, г/л:

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	2,0;
Нитрилотриуксусная кислота	5,6.

Прекультуры для всех экспериментов выращивали при 30–32°C аэробно в колбах Эрленмейера объемом 250 мл, содержащих по 100 мл среды, в течение 18–20 ч на среде приведенного выше состава с добавлением 0,5 г/л NH_4Cl . Инокулят вносили из расчета 1 мл на 100 мл среды с оптической плотностью ~0,9–1,0. Контроль чистоты культуры во всех экспериментах осуществлялся методом раздавленной капли с использованием микроскопа «Olympus» (модель C011, Япония), при увеличении в 400 раз.

2.3 Условия культивирования

2.3.1 Выращивание биопленок

Все культуры биопленок выращивали на среде СМС в оптимальных трофических условиях (0,5 г/л NH_4Cl), при 28–31°C, без перемешивания, в течение 5–6 сут. Биопленки культивировались в различных условиях: на поверхности покровных стекол и на стеклах из ZnSe (прозрачных в ИК-области), погруженных в среду СМС в чашках Петри. Культивирование биопленок на границе раздела фаз жидкость/воздух осуществлялось в колбах Эрленмейера объемом 1 л и содержащих 700 мл среды.

2.3.2 Выращивание бактерий в условиях трофического стресса

Бактерии штаммов *A. baldaniorum* Sp245, *A. brasilense* Sp7 и Cd культивировали на среде приведенного выше состава (пункт 2.2) с различными концентрациями связанного азота (NH_4Cl): 0,1; 0,21 и 0,33 г/л – трофический стресс разной степени интенсивности, 0,5 г/л – стандартные условия (оптимальные трофические условия, контроль). Все культуры выращивали в колбах Эрленмейера, содержащих 100 мл среды, в течение 8 сут, аэробно, при 32°C.

2.3.3 Культивирование бактерий для синтеза поли-3-гидроксибутирата

Культуры бактерий штаммов *A. brasilense* Sp7 и *A. baldaniorum* Sp245 выращивали на среде приведенного выше состава в условиях трофического стресса, т.е. в отсутствие источника связанного азота (NH_4Cl), в течение 3 или 9 сут, при 32°C , аэробно, в колбах Эрленмейера объемом 1 л, содержащих по 500 мл среды, при перемешивании – 180 об./мин.

2.4 Выделение и очистка поли-3-гидроксибутирата

Культуры бактерий собирали центрифугированием в течение 30 мин при 10000g, при 10°C . Собранную биомассу отмывали трижды физиологическим раствором (ФР) в том же режиме, переносили на чашку Петри и помещали в термостат при 45°C , где высушивали до постоянной массы.

Для экстракции ПГБ из клеточного материала сухую биомассу бактерий тщательно растирали в агатовой ступке 5–10 мин, помещали в грушевидную колбу с притертой крышкой на 50 мл и смешивали с 10 мл хлороформа. После этого смесь грели на водяной бане при температуре $55\text{--}57^\circ\text{C}$ в течение 1 ч, после чего добавляли еще 5 мл хлороформа и проводили экстракцию ПГБ еще 4 ч. Суспензию фильтровали через фильтровальную бумагу. Полученный фильтрат высушивали на часовом стекле.

Для удаления из выделенного полимера липидов проводили их осаждение с использованием метанола. ПГБ растворяли в 10-кратном объеме хлороформа на водяной бане в течение 10 мин. Небольшое количество нерастворившегося полимера удаляли. Соотношение раствора ПГБ к осадителю составляло 1:9. Полученный раствор инкубировали при 5°C в течение 40 мин. Выпавший осадок ПГБ отделяли от раствора центрифугированием (10000g, 10 мин) и высушивали при 45°C в сушильном шкафу.

2.5 ИК-фурье-спектроскопия

ИК-спектры образцов измеряли на ИК-фурье-спектрометре Nicolet (модель Magna-IR 560 E.S.P., США) в режиме ДО и Nicolet 6700 (Thermo Electron Corp., США) в режиме пропускания в диапазоне $4000\text{--}400\text{ см}^{-1}$ с накоплением 32 или 64 разверток спектров (разрешение 4 см^{-1}) при температуре $23\pm 2^\circ\text{C}$. Стандартная обработка спектров осуществлялась с использованием программного обеспечения OMNIC (версия 8.2.0.387), поставляемого производителем спектрометра. Обработка включала следующие этапы: 1) автоматическая коррекция базовой линии; 2) автоматическое сглаживание (не более 2-х раз); 3) «вырезание» полос в области, соответствующей углекислому газу (при необходимости); 4) определение положения максимумов полос.

2.5.1 Пробоподготовка образцов для измерения методом ИК-фурье-спектроскопии

Для измерений ИК-фурье-спектров в режиме ДО образцы бактериальной биомассы готовили в виде сухих тонкоизмельченных порошков в чашке для отбора проб Micro (Spectra-Tech Inc., США), или в виде их смеси с KBr.

Для проведения анализа методом ИКФС в режиме пропускания бактериальную биомассу (планктонные культуры) собирали центрифугированием (10 мин, $10000g$), трижды промывали физиологическим раствором и высушивали при 45°C . Затем высушенную биомассу растирали в агатовой ступке до состояния порошка в течение 5 мин, либо пропускали этот этап. Небольшое количество биомассы (20–30 мг) ресуспендировали в 200–300 мкл Milli-Q. В отдельных случаях, при малом количестве образца, количество снижали до 5 мг. Полученную суспензию в объеме 70 мкл наносили на подложку из специального стекла (ZnSe, прозрачное в ИК-области) и высушивали в сушильном шкафу при $45\text{--}50^\circ\text{C}$ до образования пленки на поверхности подложки ($\sim 1,5\text{--}2\text{ ч}$).

Биопленки, выращенные на обычных стеклах, отмывали ФР один раз, высушивали, затем счищали скальпелем и ресуспендировали в воде Milli-Q (70 мкл). Полученную суспензию наносили на подложку из ZnSe, сушили при 45–50°C до постоянной массы и затем измеряли ИК-спектры. Биопленки, выращенные на стеклах из ZnSe отмывали ФР один раз, не отделяя от стекла, так же высушивали при 45–50°C до постоянной массы и сразу измеряли ИК-спектры.

Для ИК-фурье-спектроскопических измерений образцы ПГБ готовили двумя способами. Образец измельчали и прессовали в таблетку с KBr (200 мг; диаметр 12 мм) при давлении до 7 МПа. Для измерений без KBr образец ПГБ растворяли в минимальном объеме хлороформа (0,5–1,0 мл). Полученный раствор высушивали на часовом стекле под вытяжкой в течение 1–2 ч, либо наносили на подложку из специального стекла (ZnSe, прозрачное в ИК-области) и также высушивали в сушильном шкафу при 45–50°C до образования пленки на поверхности подложки.

Пленки ПГБ с различной толщиной получали варьированием концентрации ПГБ в одинаковом объеме хлороформа. Для получения тонкой пленки растворяли 0,01 г ПГБ в 2 мл хлороформа (0,5% раствор ПГБ), для получения пленки с большей толщиной растворяли 0,04 г ПГБ в 2 мл хлороформа (2% раствор ПГБ). Полученные растворы переносили в одинаковые стаканы с плоским дном объемом 50 мл и сушили под вытяжкой в течение 3 ч.

2.5.2 Расчет содержания поли-3-гидроксибутирата и полисахаридной составляющей

Для анализа измеренных ИК-фурье-спектров рассчитывалась величина β , представляющая собой соотношение площади полосы – маркера исследуемого вещества к площади полосы амид II.

Расчет относительного количества синтезированного ПГБ (β) проводили, используя формулу:

$$\beta = S_{\nu(\text{C=O})} / S_{\text{амид II}}, \quad (2)$$

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

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

Расчет относительного количества полисахаридной составляющей (β) проводили, используя формулу:

$$\beta = S_{(\sim 1200 - 900 \text{ см}^{-1})} / S_{\text{амид II}}, \quad (3)$$

где $S_{(\sim 1200 - 900 \text{ см}^{-1})}$ – площадь полосы колебаний групп $\nu(\text{C}-\text{O})$, $\nu(\text{C}-\text{C})$, $\delta(\text{C}-\text{O}-\text{H})$ и $\delta(\text{C}-\text{O}-\text{C})$ в полисахаридах (полоса при $\sim 1200-900$ см^{-1}) как маркера содержания полисахаридной составляющей;

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

2.5.3 Метод расчета величины β

Величину β рассчитывали при помощи программного обеспечения TQ Analyst EZ Edition, поставляемого в комплекте с ИК-фурье-спектрометром (Nicolet 6700, Thermo Scientific). Для анализа полученных ИК-спектров на базе программы TQ Analyst EZ Edition разработали алгоритм, заключающийся в автоматическом измерении соотношения площадей полос валентных колебаний карбонильной группы ($\text{C}=\text{O}$) в ПГБ и пептидной полосы амид-II. Алгоритм включал следующие шаги:

1. Во вкладке «Description» выбирали пункт «Measurement only», где вводили необходимые данные в подпунктах «Method title» и «Developer's name».

2. Во вкладке «Pathlength» указывали необходимую математическую формулу – соотношение площадей полос. Для этого в меню «Pathlength Type» указывали пункт «Peak ratio or Normalize». Для определения базовой линии необходимого диапазона в таблице «Pathlength Region Table», во вкладке «Baseline type», выбирали позицию «two points». Базовую линию указывали в меню двумя фиксированными точками – 1800 («Point 1») и 1480 («Point 2»), т.е. выбирали область, которая включала

сразу две полосы: $\nu(\text{C}=\text{O})$ и амид II. Для обозначения положения полосы амид II в столбце «Region Type» указывали площадь – «Area», в «Location» вводили 1590 (верхняя строка) и 1480 (нижняя строка).

3. Во вкладке «Measurements» выбирали «Use special format», в контекстном меню выбирали «Spectrum». В таблице «Measurements table» в столбце «Measurement» вводили наименования функциональных групп измеряемых полос. В столбце «Abbrev.» указывали «M1»; в столбце «Unit» вводили проценты (%); в столбце «Digits» вводили 3 (первая строка) и 2 (вторая строка).

4. Во вкладке «Spectra» все данные оставляли по умолчанию.

5. Во вкладке «Regions» вводили данные положения полосы $\nu(\text{C}=\text{O})$. Для этого в таблице «Regions table» в столбце «Region Type» выбирали площадь – «Area», в «Location» вводили 1770 (верхняя строка) и 1710 (нижняя строка). В той же таблице дублировали значения базовой линии, указанные ранее во вкладке «Pathlength».

6. Во вкладке «Report», в меню «General information» оставляли выбранными только пункты «Method title» и «Spectrum title». В меню «Results» выбирали «Measurement unit», «Pass/Fail indicator» и «Prepend answers to a text file».

7. Для сохранения метода выбирали в главном меню пункт «File». В контекстном меню выбирали «Save method as...», после указания пути для сохранения и введения названия метода, выбирали «Сохранить».

8. Перед непосредственным использованием созданный алгоритм откалибровывали (кнопка «Calibrate» на главной панели меню).

2.5.4 Математическая обработка ИК-фурье-спектров

Для определения положения максимумов перекрывающихся полос ИК-спектры обрабатывались с помощью программного обеспечения OMNISC с получением второй производной. Для этого в программном обеспечении был выбран метод Норриса, для которого варьировались следующие параметры: длина сегмента – 3; между сегментами – 2; или: длина сегмента – 1; между сегментами – 2.

2.6 Статистическая обработка результатов

Все эксперименты проводились минимум в 3-х повторностях. Для большинства образцов ИК-спектры измерялись также в 3-х повторностях. Все ИК-спектры автоматически усреднялись при измерении (количество разверток 64), а также обрабатывались с помощью статистического пакета анализа, входящего в программное обеспечение OMNISC (версия 8.2.0.387), поставляемого производителем вместе с ИК-фурье-спектрометром.

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1 Методологические аспекты

3.1.1 Влияние полярной матрицы на биологические образцы

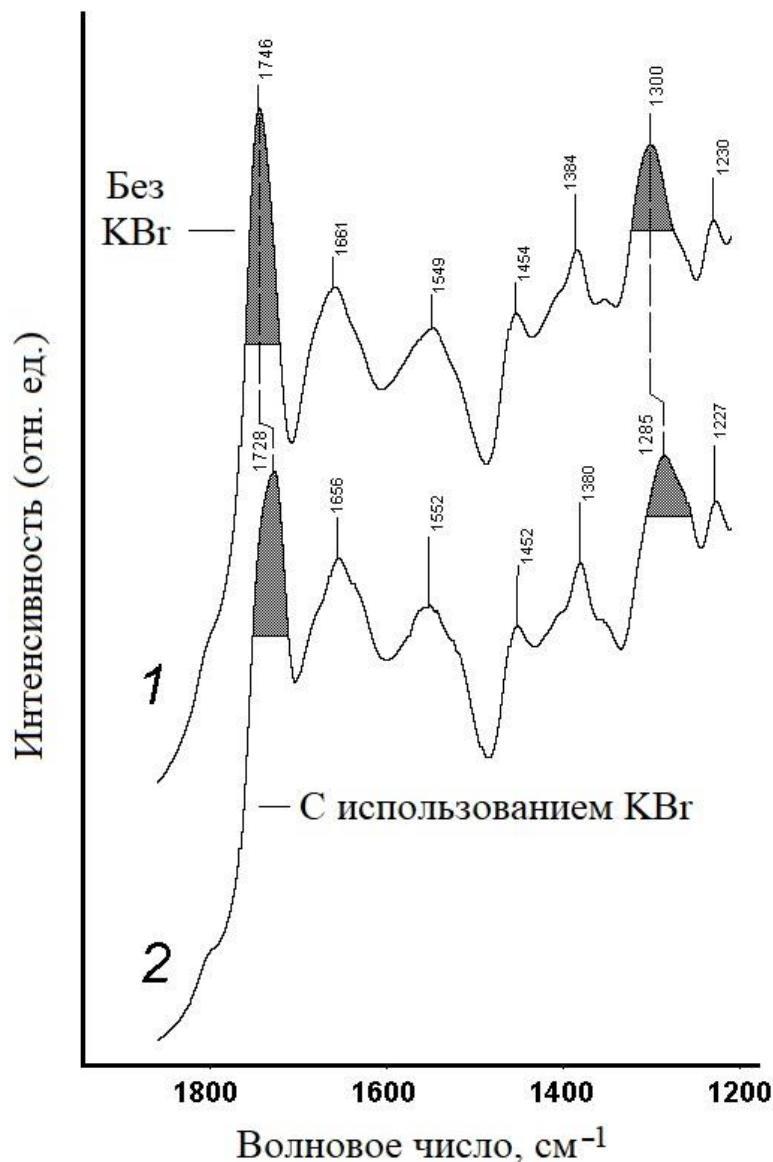
На сегодняшний день активно обсуждается влияние различных матриц при пробоподготовке (в том числе перетирание и прессование с солями галогенидов) на интенсивность и положение полос на ИК-фурье-спектрах исследуемых образцов [59, 267–271]. Для неорганических материалов было продемонстрировано сильное различие на ИК-спектрах, измеренных для образцов одного и того же вещества, приготовленных с использованием полярных (галогенидно-солевая) или неполярных (таких как нуйол, минеральное парафиновое масло) матриц, например, для $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ [270].

При исследовании биологических образцов методом ИКФС широко используются традиционные методы пробоподготовки, ранее разработанные для изучения простых химических веществ и не учитывающие сложность биоматериалов. Так, использование галогенидных матриц может повлиять на положение полос, соответствующих различным полярным функциональным группам, даже тем, которые не участвуют в формировании водородных связей [272]. Таким образом, интерпретация измеренных ИК-спектров может зависеть от используемой методики пробоподготовки биологических образцов, в некоторых случаях приводя к ошибочным выводам.

В данной части работы нами изучено влияние галогенидно-солевого матрикса (в смеси с KBr) на положение полос функциональных групп на ИК-спектрах образцов: а) ПГБ-содержащей биомассы бактерий штамма *A. baldaniorum* Sp245; б) ПГБ, выделенного из клеток бактерий того же штамма.

На Рисунке 8 представлены ИК-спектры биомассы бактерий штамма *A. baldaniorum* Sp245, измеренные в режиме ДО. Образцы подвергались различной пробоподготовке: 1) биомасса измельчалась непосредственно перед измерением;

2) биомасса измельчалась вместе с КВг (обычно используется при измерениях в режиме ДО в случае недостаточного количества образца).



1 – образец в виде порошка; 2 – образец в виде биомассы, перетертой с КВг;
 две основные полосы, относящиеся к ПГБ, выделены на рисунке затемнением

Рисунок 8 – ИК-спектры сухой биомассы бактерий штамма *A. baldaniorum* Sp245, содержащей ПГБ, измеренные в режиме ДО (DRIFT)

Поскольку бактерии выращивались на среде без связанного азота, что, как известно, инициирует биосинтез и накопление ПГБ в бактериальных клетках [14,

27, 118, 273], помимо типичных полос биомассы, например, амид I при $\sim 1660 \text{ см}^{-1}$ и амид II при $\sim 1550 \text{ см}^{-1}$, соответствующих клеточным белкам [27, 56], на ИК-спектрах присутствуют полосы, относящиеся к ПГБ. Как видно на Рисунке 8, для двух образцов наблюдается различие в положении полос ПГБ в области ~ 1740 и $\sim 1300 \text{ см}^{-1}$ (Таблица 6), которые, как известно, чувствительны к степени упорядоченности сложного полиэфира [274]. На ИК-спектре ДО образца, пробоподготовка которого включала только измельчение, данные полосы находятся в более высокочастотной области – при 1746 и 1300 см^{-1} . В случае же ИК-спектра образца, пробоподготовка которого включала измельчение с KBr, данные полосы смещались в более низкочастотную область – 1728 и 1285 см^{-1} (смещение на 18 и 15 см^{-1}), соответственно.

Аналогичные сдвиги данных полос ПГБ наблюдались и в спектре образца выделенного полимера в виде таблетки с KBr (по сравнению с образцом ПГБ без KBr), измеренного в режиме пропускания, по сравнению с пленкой выделенного ПГБ (Таблица 6).

Таблица 6 – Положения максимумов некоторых полос, соответствующих ПГБ, в исследуемых образцах

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

На Рисунке 9 представлен ИК-спектр сложного полиэфира в виде тонкой пленки, а также ИК-спектр ПГБ в полярной матрице (таблетки с KBr), измеренные в режиме пропускания. Все основные полосы ПГБ [18, 27, 275–277] хорошо разрешены, что облегчает сравнительный анализ этих ИК-спектров.

Стоит отметить, что большинство наблюдаемых полос, например, находящихся ниже 1230 см^{-1} , при 1380 , 1454 и 2850 см^{-1} , очевидно, не подвержены влиянию матрицы KBr, поскольку их максимумы на ИК-спектрах (Рисунок 9) либо совпадают, либо расходятся всего на $1\text{--}2\text{ см}^{-1}$ (что находится в пределах разрешения ИК-фурье-спектрометра) и имеют схожие интенсивности.

В то время как многие полосы относятся к неполярным функциональным группам (например, различные колебания $\nu(\text{C-H})$ в пределах $3000\text{--}2800\text{ см}^{-1}$, полоса ножничных колебаний $\delta(\text{CH}_2)$ при 1454 см^{-1} , симметричные колебания $\delta(\text{CH}_3)$ при 1380 см^{-1} , скелетные валентные колебания C-C , вносящие вклад в $\nu(\text{C-C-O})$ при $1250\text{--}1050\text{ см}^{-1}$, $\nu(\text{C-C})$ при 979 см^{-1} и различные деформационные колебания $\delta(\text{C-H})$ при меньших волновых числах) [27, 274, 275, 277–279], полоса с максимумом при 3435 см^{-1} относится к $\nu(\text{O-H})$ водородосвязанных примесей воды [275, 278, 280]. Тем не менее, поскольку эти молекулы воды образуют относительно прочные водородные связи между цепями биополимера с карбонильными группами сложноэфирных связей [275, 278, 280], они, следовательно, в определенной степени «защищены» от воздействия полярной матрицы KBr (сдвига данной полосы не наблюдается).

Из Рисунка 9 ясно видно, что уширенные и, очевидно, составные полосы в пределах $1750\text{--}1720$ и $1300\text{--}1270\text{ см}^{-1}$ чувствительны к матрице KBr (Таблица 6). Область при $1750\text{--}1720\text{ см}^{-1}$ соответствует валентным колебаниям сложноэфирной карбонильной группы $\nu(\text{C=O})$, чувствительной к степени упорядоченности ПГБ [274, 278, 280, 281].

Так, полоса с максимумом при 1745 см^{-1} относится к более аморфной фазе ПГБ, в то время как полоса при 1724 см^{-1} (Рисунок 9) относится к упорядоченной структуре. Однако на спектре образца, приготовленного в виде таблетки с KBr, максимум аморфной части сдвинут до 1730 см^{-1} (т.е., на -15 см^{-1} ; Рисунок 9, Таблица 6).

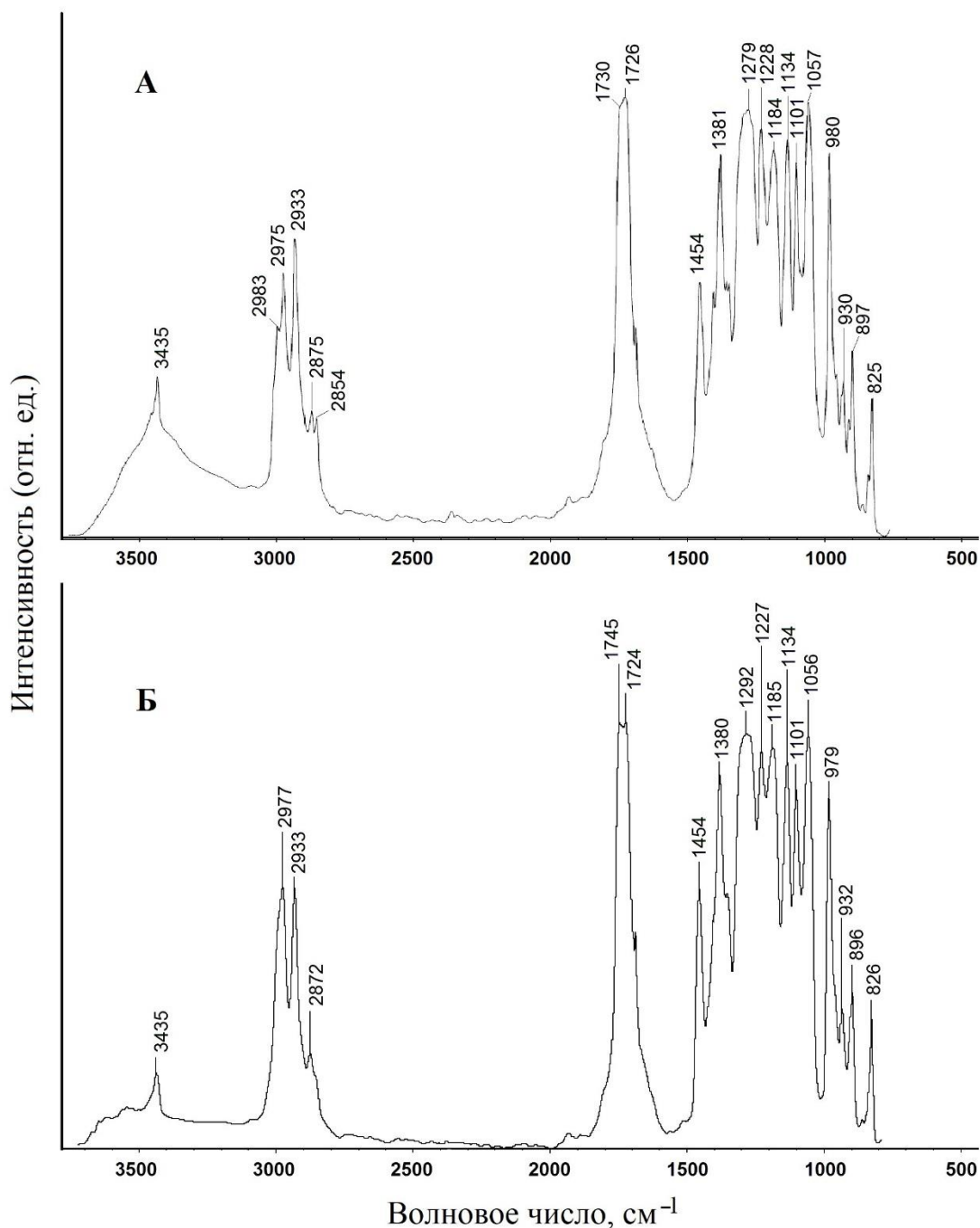


Рисунок 9 – ИК-спектры поли-3-гидроксибутирата, выделенного из клеток бактерий штамма *A. baldaniorum* Sp245, в режиме пропускания в виде тонкой пленки (Б) и в виде таблетки с KBr (А)

Хотя такое направление сдвига может объясняться влиянием полярной матрицы, его относительно большая величина (15 см^{-1}), очевидно, является результатом частичной кристаллизации аморфной составляющей, вызванной измельчением образца с KBr. Это предположение подтверждается сопутствующим

сдвигом максимума уширенной полосы $\nu(\text{C}-\text{C}-\text{O}/\text{C}-\text{O}-\text{C})$ с 1292 на 1279 cm^{-1} (т.е., на -13 cm^{-1} ; Рисунок 9, Таблица 6), которая также чувствительна к степени упорядоченности ПГБ [281].

Согласно полученным экспериментальным данным, для всех изученных образцов показаны значительные сдвиги (на $-13 \dots -18 \text{ cm}^{-1}$) максимумов полос сложноэфирной группы $\nu(\text{C}=\text{O})$ и $\nu(\text{C}-\text{C}-\text{O}/\text{C}-\text{O}-\text{C})$ в ПГБ при измерении в режиме ДО для порошков с KBr или в режиме пропускания в таблетках, прессованных с KBr. Эти сдвиги, наиболее вероятно, связаны с процессами кристаллизации аморфной составляющей ПГБ, вызванными измельчением биомассы с KBr (и дальнейшим прессованием выделенного ПГБ в таблетках с KBr) [60]. Следовательно, для неинвазивного анализа таких чувствительных биомакромолекулярных образцов, необходима методология пробоподготовки без использования галогенидной матрицы.

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

В настоящее время метод ИКФС все более часто используется в микробиологических исследованиях. Большой объем исследований позволил получить обширный пул данных, на основе которого сформированы базы данных для анализа, идентификации и дифференциации ИК-спектров различных биологических образцов и микробиологических объектов. Но, несмотря на это, стандартизированная пробоподготовка для их анализа методом ИКФС все еще не разработана. На данный момент в литературе опубликована только одна статья, посвященная вопросу методологии ИКФС биологических материалов [66]. Однако в ней отсутствует обсуждение пробоподготовки микробиологических объектов.

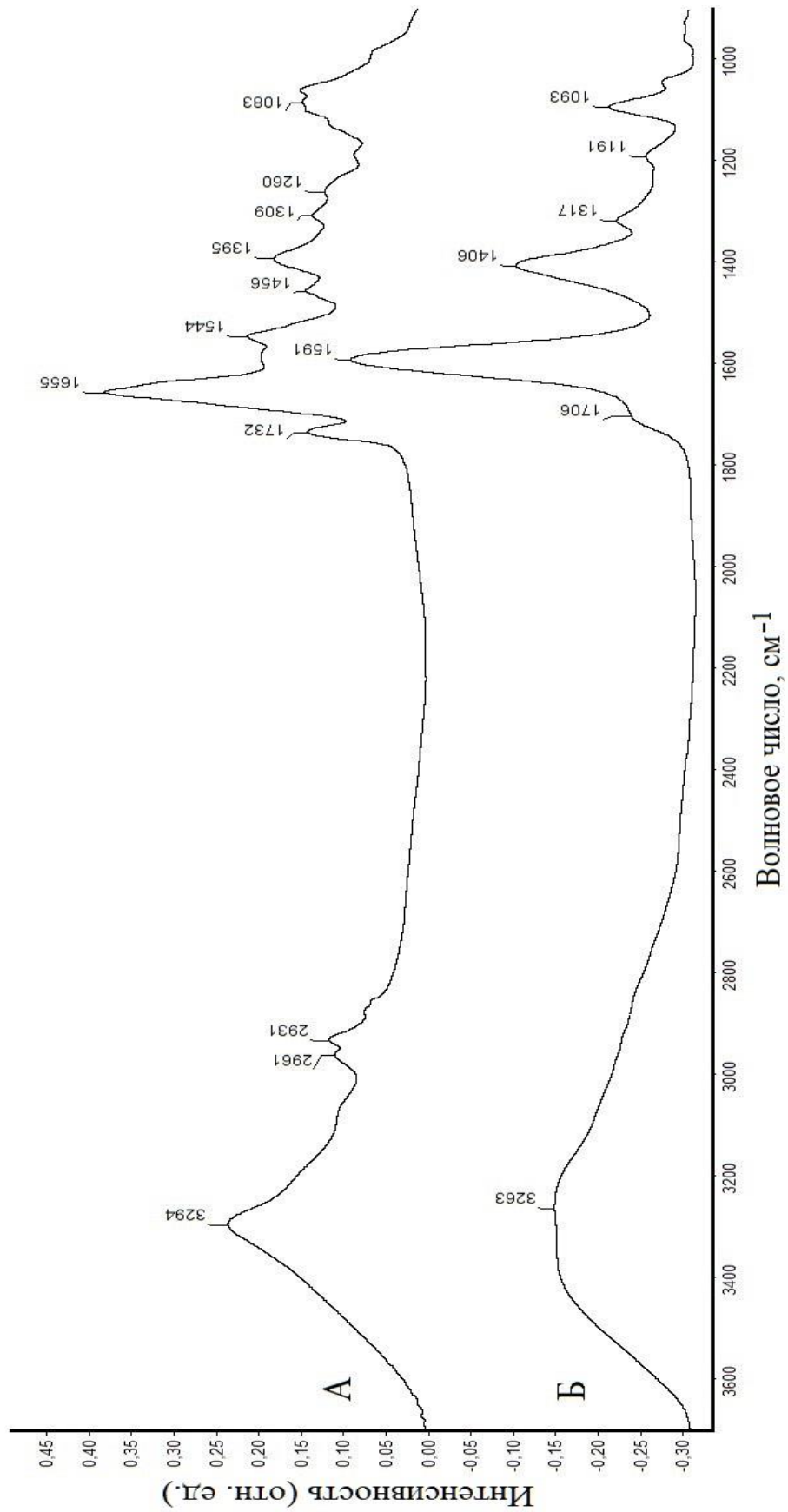
До недавнего времени в лабораторных условиях все больше изучались бактериальные сообщества, культивируемые в виде планктонных культур или колоний. В последние десятилетия активно изучаются биопленки – сложные микробные консорциумы, формируемые бактериями в естественных условиях [2,

31–36]. Биопленки бактерий могут формироваться как на жидких средах, так и на твердых, абиогенных или биогенных по своей природе, поверхностях с различными физико-химическими свойствами. Поэтому необходима стандартизация и разработка методологии подготовки выращиваемых в различных условиях бактериальных образцов для ИКФС, что и стало первым этапом в нашем исследовании.

Для разработки методики пробоподготовки образцов использовался эндофитный штамм *A. baldaniorum* Sp245. Во всех экспериментах в данном разделе в качестве контроля бралась бактериальная планктонная культура, культивируемая 18 ч, аэробно, при оптимальных питательных условиях на жидкой среде Доберейнер [266].

Для разработки пробоподготовки планктонная культура бактерий штамма Sp245 выращивалась также на жидкой среде Доберейнер при оптимальных условиях (0,5 г/л NH_4Cl , 28–31°C аэробно, 180 об./мин, 18 ч). Биопленки выращивали при различных условиях: на границах раздела фаз твердая поверхность/жидкость и жидкость/воздух (на среде СМС). Биопленки на твердой поверхности выращивали в 2-х вариантах: на подложке из обычного стекла (на основе SiO_2) и на стекле из ZnSe – соединения, прозрачного в среднем ИК-диапазоне. Выращивание культуры непосредственно на стеклах из ZnSe позволило свести к минимуму физическое воздействие на зрелую биопленку.

Первым этапом при пробоподготовке образцов, выращенных на стеклах из ZnSe , была отмывка биопленки от среды выращивания. Отмывка является одним из важных и необходимых этапов в пробоподготовке, поскольку компоненты среды могут вносить вклад в измеряемый спектр биопленки, делая затруднительным достоверный анализ данных. Как видно на Рисунке 10Б, на ИК-спектре среды СМС, используемой для выращивания штаммов (высушенная в виде тонкой пленки на поверхности стекла из ZnSe), некоторые полосы находятся в той же области, что и полосы биологических образцов (Рисунок 10А, Таблица 7). К ним относится полоса в области около 3263 см^{-1} , соответствующая связям O–H и N–H в белковых и полисахаридных молекулах.



А – биопленки, формируемые на стекле из ZnSe в течение 6 сут;

Б – среда культивирования (СМС)

Рисунок 10 – ИК-спектры биопленок *A. baldaniorum* Sp245 и среды СМС

Таблица 7 – Основные полосы на ИК-спектрах среды СМС и 6-сут биопленок, сформированных бактериями штамма *A. baldaniorum* Sp245, и их соотнесение с функциональными группами [8, 56, 57, 69]

Образец		Соотнесение основных полос с функциональными группами (волновые числа, см ⁻¹)
Среда СМС	Биопленка	
Плато при 3200–3400	Широкая полоса при 3294	О–Н; N–Н (амид А в белках), ν
–	2961	С–Н в CH ₃ , ν_{as}
–	2931	С–Н в >CH ₂ , ν_{as}
–	1732	C=O, ν (фосфолипиды, ПГБ)
плечо при 1706	–	C=O, ν (в карбоксильной группе)
–	1655	амид I (в белках)
1591	–	Карбоксил COO ⁻ , ν_{as}
–	1544	амид II (в белках)
–	1456	–CH ₃ , δ (в белках, жирах, полиэфирах и т.д.)
1406	1395	COO ⁻ , ν_s
1317	–	С–О, ν (в малате)
–	1309	С–О–С/С–С–О, ν (в эфирах)
–	1260	амид III/O–P=O, ν_{as}
1191 1093	1083	С–О, С–С, С–ОН, ν ; С–О–Н, С–О–С, δ (полисахариды)
–	839	Область «истинных отпечатков пальцев» (на рисунке не представлена, поскольку является малоинформативной)
670	669 620	

Примечание: ν – валентные колебания; ν_s – симметричные валентные колебания; ν_{as} – асимметричные валентные колебания; δ – деформационные колебания; прочерк (–) означает отсутствие полосы.

Также к ним относится полоса при 1706 см⁻¹, соответствующая связи С=О карбоксильной группы в полиэфирах и фосфолипидах бактериальных клеток.

Заметный вклад дают полосы при 1591, 1406, 1317, 1191 и 1093 см^{-1} , которые находятся в области «отпечатков пальцев» на бактериальных ИК-спектрах. Значительный вклад в ИК-спектр вносит также полоса среды при 1591 см^{-1} , и которая на ИК-спектре бактериальной культуры находится между полосами амид I и амид II (Рисунок 10). Данная полоса не мешает при анализе общего макромолекулярного состава, но значительно затрудняет количественную оценку белковой составляющей при более тщательном анализе ИК-спектров.

При пробоподготовке бактериальной культуры для ее измерения в режиме пропускания важно соблюсти необходимую толщину образца для оптимального соотношения сигнал/шум на ИК-спектрах. Однако при выращивании образца непосредственно на стеклах из ZnSe не всегда формировались биопленки достаточной толщины по всей поверхности, что приводило к снижению соотношения сигнал/шум на измеряемых ИК-спектрах. Помимо этого, при пробоподготовке биопленок, выращенных на поверхности стекол, многоразовая (2–3 раза) отмывка приводила к значительным потерям образца.

Ввиду вышесказанного, в случае выращивания биопленок на стеклах из ZnSe оптимальной стала однократная отмывка биопленки.

ИК-спектр биопленки (Рисунок 10), отмытой один раз, имеет сходную картину с ИК-спектром контроля (чистая биомасса), и на нем так же присутствуют полосы связей всех основных макрокомпонентов клетки (Таблица 7).

Помимо полос, соответствующим белкам, полисахаридам и т.д., также присутствуют полосы, соответствующие компонентам среды, что свидетельствует о ее неполном удалении при одной отмывке.

Поскольку полосы среды вносят вклад в спектры бактериальных образцов, проводить достаточно точный количественный анализ спектров биопленок таких образцов не представляется возможным. Однако спектры таких образцов можно использовать для определения наличия конкретных макрокомпонентов бактериальных клеток, полосы которых не пересекаются с полосами среды.

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

Таким образом, использование такой пробоподготовки (удаление среды с оставшейся планктонной культурой из биопленки, сформированной на ZnSe, с последующей сушкой при 45°C) с выращиванием биопленок непосредственно на стеклах из ZnSe и единичной отмывкой стоит применять только для качественного анализа.

Биопленки на поверхности обычных стекол, также, как и выращенные на стеклах из ZnSe, не всегда нарастали до достаточного объема. На основе вышеописанных результатов проводили однократную отмывку биопленок. Биопленки высушивали и аккуратно счищали с поверхности стекла скальпелем, затем измельчали, ресуспендировали в небольшом количестве Milli-Q и наносили на стекло из ZnSe с последующим высушиванием при 45°C. Измеренный спектр образца биопленки, подготовленный таким способом, был аналогичен спектру, полученному для биопленки, выращенной на стекле из ZnSe.

В случае пробоподготовки планктонной культуры биомасса нарастала в большом количестве. При ОП культуры равной ~1 оптимальное количество жидкой культуры, отбираемой для анализа, составило ~10–15 мл. Культура отделялась от среды центрифугированием ($g=10000$, $t=10$ мин, при 4°C). Поскольку в данных условиях нарастал достаточно большой объем биомассы и не образовывались какие-либо внеклеточные структуры (в отличие от биопленок), многократная отмывка не приводила к значимым потерям каких-либо компонентов. Таким образом, планктонную культуру отмывали трижды. Затем ее высушивали при 45–50°C до постоянной массы, измельчали в агатовой ступке в течение 5 мин, 100–200 мкг измельченного образца ресуспендировали в 100–200 мкл Milli-Q. После этого 70 мкл суспензии наносили на стекла из ZnSe и высушивали при 45–50°C в течение (~2–4 ч).

На Рисунке 11 представлен спектр планктонной бактериальной культуры штамма *A. baldaniorum* Sp245. Как можно видеть, ИК-спектр планктонной культуры имеет сходную картину с ИК-спектрами планктонных культур данного штамма, измеренных ранее, на которых четко определяются полосы, соответствующие белкам (полосы при 1653 см^{-1} – амид I, и 1541 см^{-1} – амид II), полисахаридам (полосы при 3290 см^{-1} и 1069 см^{-1}) и др. [12, 18, 27].

Таким образом, пробоподготовка в случае планктонной культуры включала в себя: (1) отбор 10–15 мл выросшей жидкой планктонной культуры; (2) ее осаждение центрифугированием, (3) 3-кратную отмывку ФР, (4) высушивание при 45°C до постоянной массы, (5) измельчение, (6) ресуспендирование, (7) нанесение на стекло из ZnSe и (8) высушивание. Подобная пробоподготовка использовалась также и для образцов биопленок, выращенных на границе раздела фаз жидкость/воздух, поскольку в этом случае биомасса нарастала активно и проблем с дальнейшей отмывкой не возникало.

Данная методика также была применена при изучении других микробиологических образцов, таких как наночастицы селена, выделенные из клеток бактерий азоспирилл. Была использована пробоподготовка, предложенная для биопленок, выращенных на стеклах из ZnSe. В данном случае многократная отмывка (2–3 раза) аналогичным образом приводила не только к значительным потерям образца, но и к заметным изменениям в его структуре, что отображалось в изменении положения максимумов и интенсивности полос на ИК-спектрах [58, 60–63].

В некоторых случаях ресуспендирование образцов биопленок и планктонных культур проводилось без предварительного измельчения в агатовой ступке. Исключение данного этапа из пробоподготовки объясняется тем, что при росте бактериальной культуры на жидких средах в стрессовых условиях (высокое соотношение C:N, добавление ТМ) бактерии начинают агрегировать друг с другом, образуя видимые флоккулы, или «хлопья» [254].

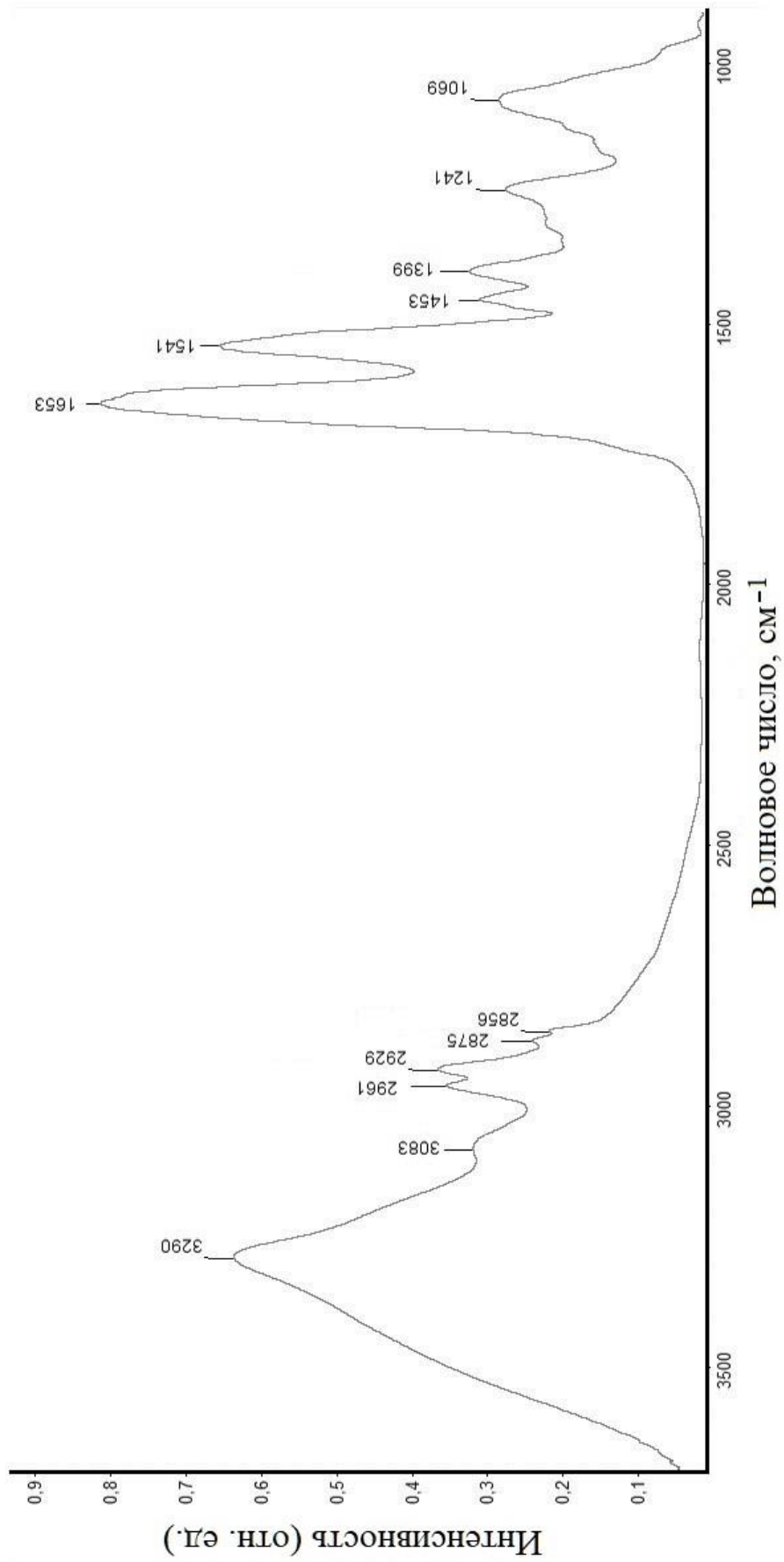


Рисунок 11 – ИК-спектр планктонной культуры *A. baldaniorum* Sp245, культивируемой в оптимальных условиях

После отбора образца и высушивания культуры в виде таких «хлопьев» дальнейшее их измельчение было трудноосуществимо – образцы «размазывались» по поверхности в виде пленок. К таким высушенным культурам добавляли стандартный объем Milli-Q (150–200 мкл) без ее предварительного измельчения и проводили медленное ресуспендирование с получением гомогенной суспензии образца.

Данного объема суспензии было достаточно для получения тонкого слоя на поверхности стекла из ZnSe, необходимого для измерения методом ИКФС. Также ресуспендирование высушенной культуры без ее измельчения проводилось в тех случаях, когда образца было недостаточно и измельчение могло приводить к потерям значительного количества вещества.

Таким образом, при исключении из пробоподготовки этапа измельчения, метод ИКФС позволял сохранить измеряемые образцы, в том числе и для их дальнейшего изучения, поскольку в таком случае в ходе пробоподготовки с исследуемым веществом не производились какие-либо манипуляции, приводящие к его необратимым изменениям или значительным потерям. Как правило, бактерии, выращенные в оптимальных условиях культивирования, ресуспендировались в Milli-Q легче и быстрее, нежели чем высушенные культуры, росшие в стрессовых условиях.

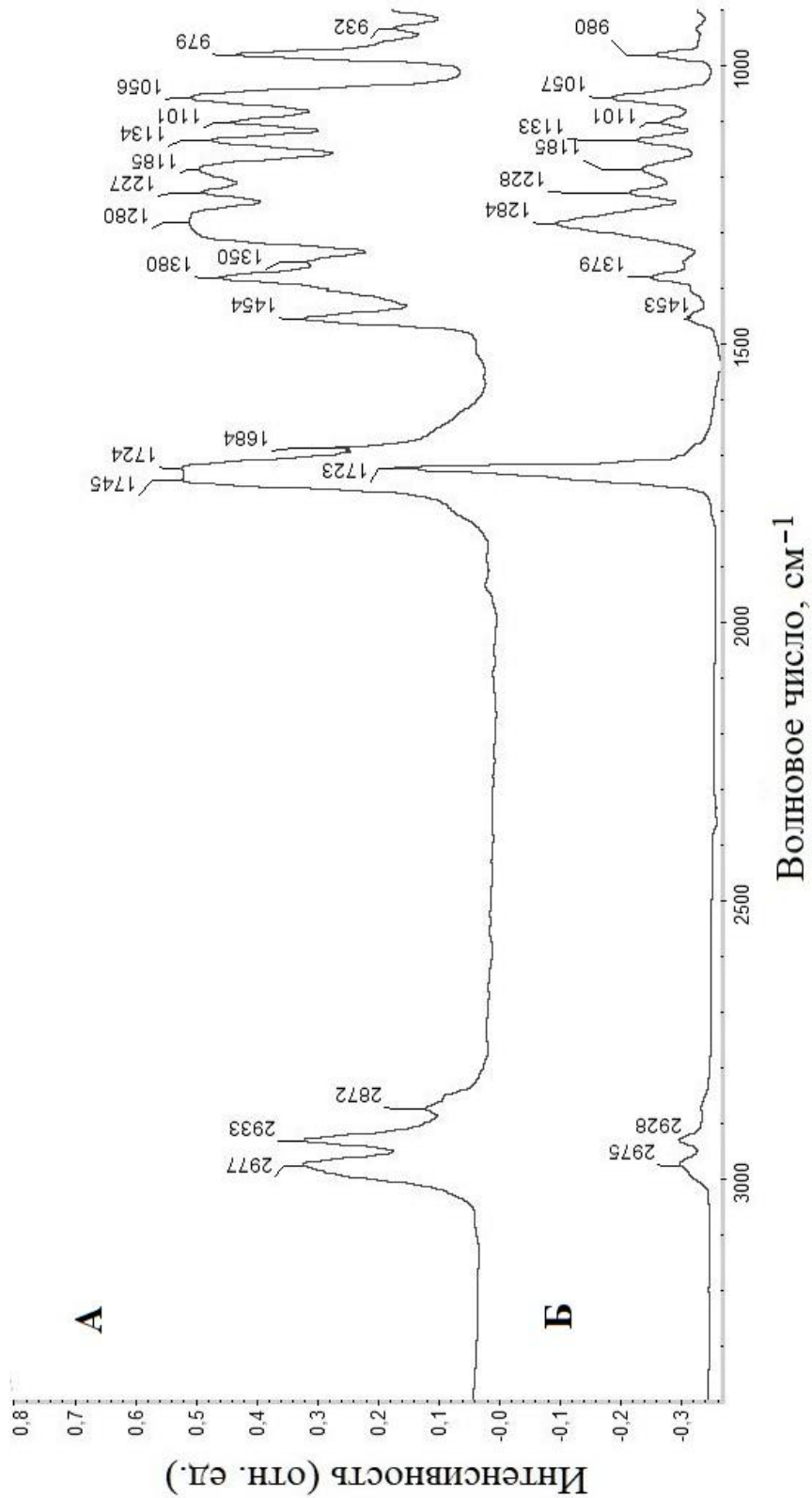
Измеренные ИК-спектры образцов культур, пробоподготовка которых проводилась без предварительного измельчения, не характеризовались какими-либо значительными отличиями от ИК-спектров тех же образцов, пробоподготовка которых включала предварительное измельчение, за исключением некоторых изменений в степени упорядоченности внутриклеточного ПГБ (сдвиг максимума полосы валентных колебаний групп C=O), накопленного клетками бактерий. При этом положение и интенсивности всех остальных полос ИК-спектров оставались неизменными. Следовательно, данный этап не является критичным при анализе общего макромолекулярного состава клеток бактерий.

Таким образом, была разработана методика пробоподготовки образцов биопленок и планктонной культуры для измерения спектров ИКФС в режиме пропускания (transmission) включающая следующие этапы: выращивание бактериальной культуры; отмывка (единичная – для биопленок, культивируемых на стеклах, 3-кратная – для планктонной культуры); высушивание и измельчение в агатовой ступке (при необходимости); ресуспендирование в минимальном объеме воды Milli-Q (100–200 мкл); нанесение в виде суспензии с Milli-Q (70 мкл) на диски из ZnSe и высушивание при 45°C в течение 2–4 ч. Данная методика была использована во всех последующих экспериментах.

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

Следующим этапом эксперимента стало изучение пленок выделенного ПГБ методом ИКФС в режиме пропускания. В качестве продуцента ПГБ использовались бактерии штамма *A. baldaniorum* Sp245. Первоначально пленки выделенного ПГБ исследовали через 2 и 14 мес хранения.

Анализ ИК-спектров показал, что образцы ПГБ обладали разной степенью кристалличности. Так, на ИК-спектре образца, хранящегося 14 мес, наблюдалась полоса $\nu(\text{C}=\text{O})$ с максимумом при 1723 см^{-1} , что соответствует упорядоченной структуре, в то время как для образца, хранящегося 2 мес, данная область была заметно уширена и обладала сразу двумя максимумами полосы карбонильной группы: при 1745 см^{-1} , соответствующий аморфной составляющей, и при 1724 см^{-1} , характерный для упорядоченной структуры (Рисунок 12) [281]. Помимо типичных полос, соответствующих функциональным группам в сложном полиэфире, на ИК-спектре образца, хранящегося в течение 2 мес, также наблюдался максимум при 1684 см^{-1} , присутствовавший лишь в виде слабого плеча на спектре образца сроком хранения 14 мес, и соответствующий колебаниям $\delta(\text{H}-\text{O}-\text{H})$ в молекулах связанной воды [275, 278, 280, 282].



А – образец ПГБ, хранящийся 2 мес;

Б – образец ПГБ, хранящийся 14 мес

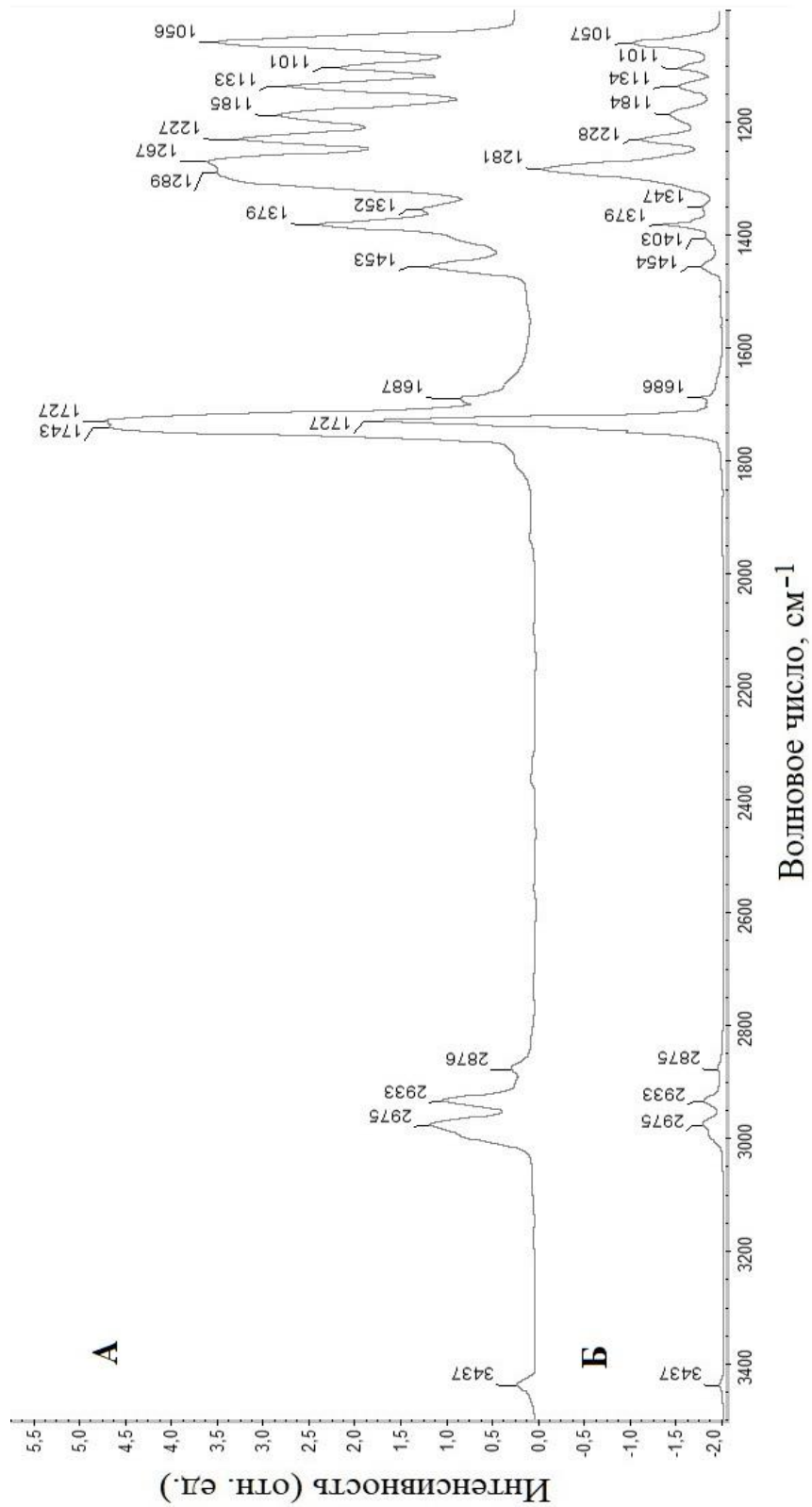
Рисунок 12 – Спектры образцов ПГБ, выделенных из клеток штамма *A. baldaniorum* Sp245

Было предположено, что изменения в структуре ПГБ могли быть связаны либо со сроком хранения, либо с толщиной пленки полимера, которая в этом случае не контролировалась. Дальнейший мониторинг изучаемых образцов пленок в течение шести месяцев не показал изменений в их структуре.

В режиме пропускания были изучены образцы пленок ПГБ с разной толщиной. Более тонкую пленку получали высушиванием 0,5% раствора ПГБ в хлороформе, более толстую пленку – высушиванием 2% раствора.

Как видно на Рисунке 13, ИК-спектр тонкой пленки ПГБ характеризовался упорядоченной структурой (максимум карбонильной группы $\nu(\text{C}=\text{O})$ при 1726 см^{-1}) (Рисунок 13Б). На ИК-спектре образца более толстой пленки наблюдались два максимума карбонильной группы при 1745 см^{-1} и 1724 см^{-1} , что отвечает соответственно аморфной и упорядоченной структуре (Рисунок 13А).

Известно, что максимум полосы $\nu(\text{C}=\text{O})$, чувствительной к степени упорядоченности ПГБ, может находиться в пределах от 1750 до 1720 см^{-1} (т.е. в достаточно узком диапазоне шириной всего $\sim 30 \text{ см}^{-1}$) [281]. Чем ближе к 1720 см^{-1} находится максимум, тем более упорядоченную структуру имеет ПГБ. И наоборот, чем ближе максимум к 1750 см^{-1} , тем более аморфной структурой обладает данный полимер (последнее объясняется нарушением слабых водородных связей между цепями ПГБ; см. ниже; Рисунок 14). Важно отметить, что разрешающая способность ИК-фурье-спектрометра в наших экспериментах составляла 4 см^{-1} , т.е. наблюдаемые в данном исследовании смещения максимумов полос более чем на 10 см^{-1} существенно превышают погрешность спектрометра. Следовательно, наблюдаемое смещение максимума $\nu(\text{C}=\text{O})$ совместно со смещением другой полосы – $\nu(\text{C}-\text{C}-\text{O}/\text{C}-\text{O}-\text{C})$ при 1281 см^{-1} (Рисунок 13), также чувствительной к степени упорядоченности ПГБ, однозначно свидетельствует об изменении соотношения упорядоченной и аморфной структур в ПГБ. В данном случае единственным параметром, изменяемым при подготовке образцов ПГБ, была их толщина.



А – пленка ПГБ с большей толщиной;

Б – пленка ПГБ с меньшей толщиной

Рисунок 13 – Спектры образцов ПГБ, выделенных из клеток штамма *A. baldaniorum* Sp245

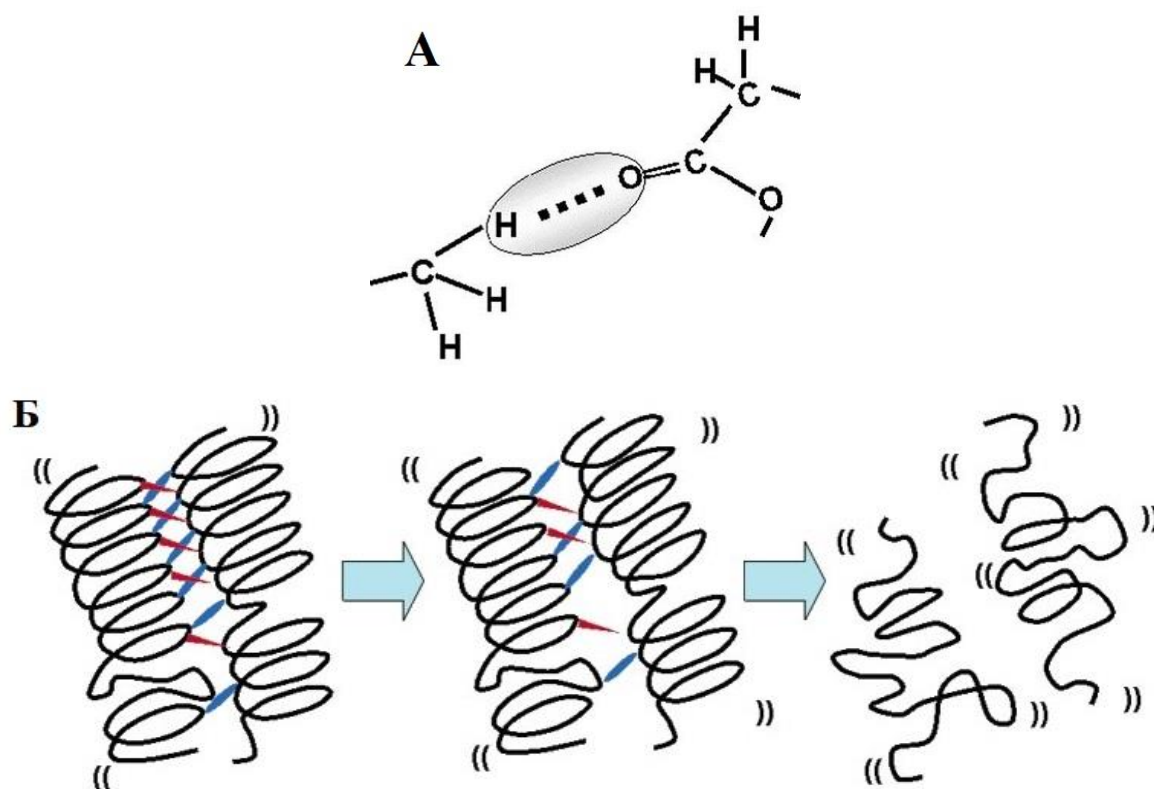


Рисунок 14 – Слабая Н-связь ($C-H \cdots O$) между спиралями ПГБ, образующаяся между группами $C=O$ и CH_3 (А) и модель структуры ПГБ с разрушением слабых Н-связей при плавлении (Б) [133, 283]

Было зафиксировано, что с увеличением толщины пленки увеличивалось и относительное содержание аморфной составляющей.

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

Упорядоченное состояние полимера (кристалличность) – это правильная укладка как цепей макромолекул относительно друг друга, так и их боковых заместителей. Связи между ними формируют дальний порядок – упорядоченную структуру полимера, – и разрушение этих связей (Рисунок 14Б), например, при

плавлении, приводит к разупорядочению структуры полимера и увеличению относительного содержания его аморфной составляющей [133].

Параллельные спиральные структуры в ПГБ связаны между собой регулярными слабыми водородными связями $C-H \cdots O$ (Рисунок 14А), образующимися между атомом Н в одной из трех связей $C-H$ в группе CH_3 и атомом О в карбонильной группе [283].

Таким образом, увеличение содержания аморфной фазы в более толстой пленке ПГБ можно объяснить нарушением слабых водородных связей между цепями ПГБ в объеме пленки (но не на ее поверхности). Нарушение этих связей происходит в силу присутствия в объеме образца молекул воды (максимумы при 3437 и 1687 cm^{-1} , Рисунок 13). Последние встраиваются между соседними цепями полимера, образуя с ними более прочные мостики Н-связей типа $>C=O \cdots H-O-H \cdots O=C<$, приводя к смещению цепей ПГБ относительно друг друга и, следовательно, нарушению целостности его структуры. Для более толстых пленок этот эффект более заметен в силу того, что при увеличении количества соседних цепей, даже при сохранении соотношения количества молекул связанной воды к молекулам сложного полиэфира, происходит аддитивное увеличение нарушений положения цепей относительно друг друга, т.е. нарушается дальний порядок в полимере, что приводит к увеличению содержания менее упорядоченной структуры.

Таким образом, экспериментально установлено, что степень упорядоченности ПГБ зависит от толщины пленки. Присутствие аморфной фазы в пленках с большей толщиной объясняется частичным разрушением дальнего порядка в полимере вследствие смещения его цепей относительно друг друга. Данное смещение происходит из-за нарушения слабых «структурирующих» водородных связей типа $CH_3 \cdots O=C<$ между спиральными структурами полимера в результате присутствия молекул воды, фиксированных значительно более прочными водородными связями со сложноэфирными фрагментами биополимера.

Полученные результаты могут иметь важное значение для правильного структурного и композиционного анализа различных биомакромолекулярных образцов, особенно тех, которые содержат структурно значимые внутри- или межмолекулярные водородные связи и/или значительную долю полярных функциональных групп.

3.1.4 Алгоритм расчета содержания компонентов биомассы на основании соотношения площадей полос

Известно, что на ИК-спектрах ПГБ (и другие ПГА) дает ряд характерных полос, соответствующих: валентным С–Н-колебаниям групп CH_2 и CH_3 , в области $3000 - 2800\text{см}^{-1}$; валентным колебаниям карбонильной группы $\nu(\text{C}=\text{O})$ сложноэфирного фрагмента макромолекулы биополимера в области $\sim 1750\text{--}1720\text{ см}^{-1}$; колебаниям связей С–О–С/С–С–О полиэфирной цепи в области $1350\text{--}1110\text{ см}^{-1}$ [18, 27, 274, 281, 284]. На ИК-спектрах бактериальных клеток полоса карбонильной группы $\nu(\text{C}=\text{O})$, в отличие от остальных, не перекрывается другими полосами, соответствующим основным биомакромолекулам в микробиологических образцах, позволяя легко идентифицировать и проводить определение ПГБ *in situ* (как есть, без выделения из клеток) методом ИКФС. В силу этого полоса $\nu(\text{C}=\text{O})$ использовалась в работе в качестве маркера ПГБ.

Для анализа уровня накопления внутриклеточного ПГБ первоначально был выбран метод, предложенный в статье [56]. Метод основан на анализе соотношения интенсивностей полосы валентных колебаний $\nu(\text{C}=\text{O})$ в области $\sim 1750\text{--}1720\text{ см}^{-1}$, являющейся маркером ПГБ, и полосы амид II около 1550 см^{-1} , характерной для клеточных белков. Однако данный метод не учитывает тот факт, что ПГБ по своей природе характеризуется различной степенью упорядоченности. На ИК-спектрах это отражается в изменении ширины полосы С=О и перераспределении максимумов (более низкочастотные значения соответствуют ПГБ, находящемуся в упорядоченном состоянии,

высокочастотные – аморфному) [281]. Ввиду этого узкая, но интенсивная полоса C=O не всегда соответствует большим количествам внутриклеточного ПГБ, свидетельствуя лишь о значительном преобладании упорядоченной или аморфной структур в биополимере.

Для более достоверного анализа количества синтезированного ПГБ нами предложено рассчитывать соотношение площадей полос (а не интенсивностей), обозначенное нами как β .

Таким образом, расчет относительного количества синтезированного ПГБ (величины β) проводили, используя формулу (2):

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

где $S_{\nu(C=O)}$ – площадь полосы валентных колебаний карбонильной группы (C=O) в ПГБ (~ 1730) см^{-1} как маркера содержания ПГБ; $S_{\text{амид II}}$ – площадь полосы амид II (соответствующей клеточным белкам; ~ 1550 см^{-1}).

Схема измерения соответствующих площадей представлена на Рисунке 15.

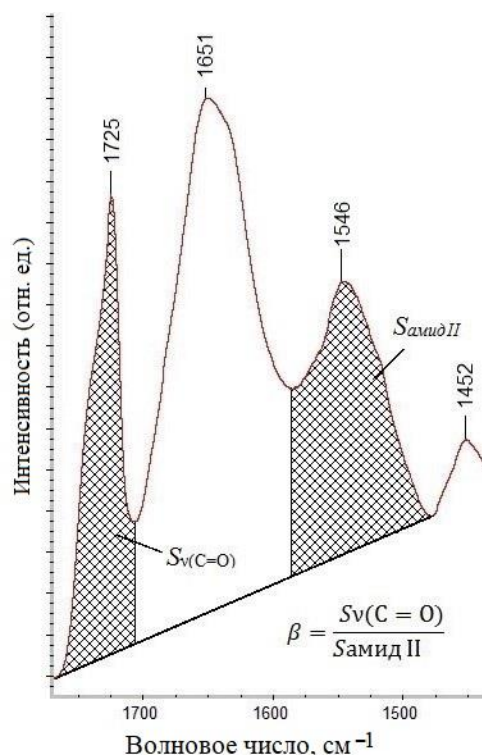


Рисунок 15 – Схема определения площадей полос для расчета величины β

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

Сходным образом нами рассчитывалась величина β для полисахаридной составляющей. Расчет осуществлялся по формуле (3):

$$\beta = S_{(\sim 1200 - 900 \text{ см}^{-1})} / S_{\text{амид II}},$$

где $S_{(\sim 1200 - 900 \text{ см}^{-1})}$ – площадь полосы колебаний групп $\nu(\text{C-O})$, $\nu(\text{C-C})$, $\delta(\text{C-O-H})$ и $\delta(\text{C-O-C})$ в полисахаридах (полоса при $\sim 1200\text{--}900 \text{ см}^{-1}$) как маркера содержания полисахаридной составляющей;

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

Схема измерения соответствующих площадей представлена на Рисунке 16.

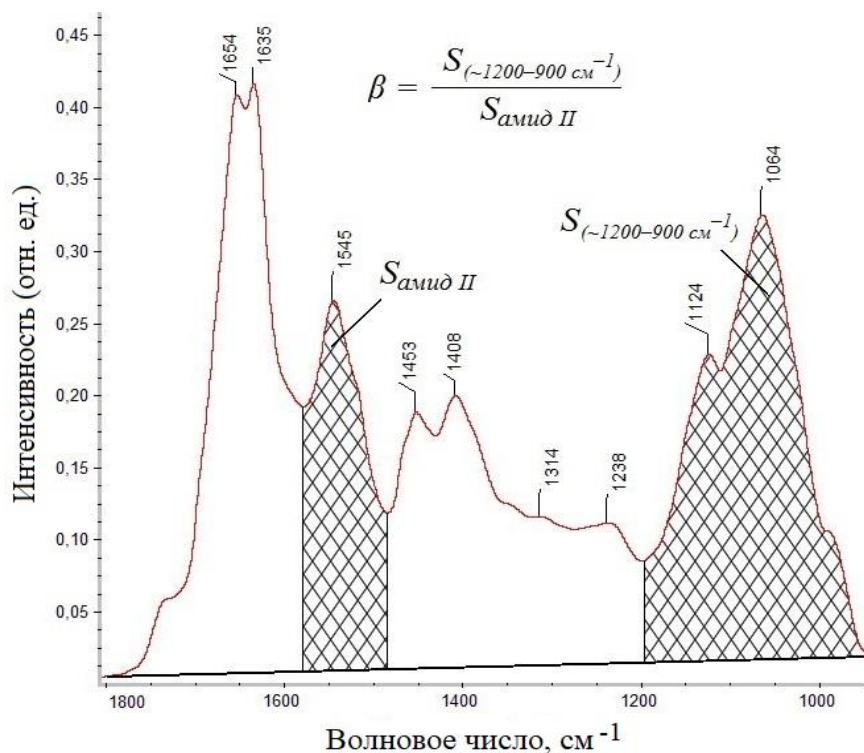


Рисунок 16 – Схема определения площадей полос для расчета величины β для полисахаридной составляющей

Таким образом, нами предложена новая методика, основанная на расчете площадей полос (вместо использовавшихся ранее интенсивностей полос) для определения относительного содержания макромолекулярных соединений в сухой биомассе, с использованием четко разрешенной полосы-маркера (полоса при $\sim 1720^{-1}$ см для ПГБ и полоса при $\sim 1200\text{--}900$ см $^{-1}$ для полисахаридов) и полосы амид II белковой составляющей (ок. 1540 см $^{-1}$).

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

Для многих бактерий одной из основных стратегий выживания является синтез ПГА, играющих роль запасов углерода и энергии при неблагоприятных условиях [263, 285]. К синтезу ПГА, а именно ПГБ, способны и бактерии видов *A. baldaniorum* и *A. brasilense*. ПГБ способен накапливаться в клетках этих бактерий под воздействием различных стрессовых факторов. При трофическом стрессе основным фактором, управляющим синтезом ПГБ у *Azospirillum*, является соотношение C:N в среде [14]. Азоспириллы способны синтезировать ПГБ в культуре при отношении C:N \sim 20 [261]. Для штамма *A. brasilense* Sp7 показан синтез значительных количеств сложного полиэфира в том числе и при добавлении в среду ТМ [18]. Для бактерий видов *A. baldaniorum* и *A. brasilense* известно, что максимальные количества ПГБ накапливаются при полном отсутствии источника азота в среде (трофический стресс), что также является фактором, индуцирующим фиксацию атмосферного азота [286].

К настоящему моменту проведено большое количество исследований, посвященных изучению метаболического ответа бактерий на воздействие разнообразных стрессовых факторов, часть из которых посвящена изучению синтеза ПГБ бактериями видов *A. baldaniorum* и *A. brasilense*. Так, ранее было показано, что бактерии штамма *A. baldaniorum* Sp245 способны к его синтезу при полном удалении источника азота из среды (азотфиксирующие условия). В таких

условиях значительные количества ПГБ синтезировались этим штаммом уже на 3 сут (66 ч) культивирования [27]. Также, было обнаружено, что на среде СМС без добавления азота бактерии штаммов *A. baldaniorum* Sp245 и *A. brasilense* Sp7 могут накапливать заметные количества ПГБ уже на 2 сут роста при микроаэробном выращивании [18].

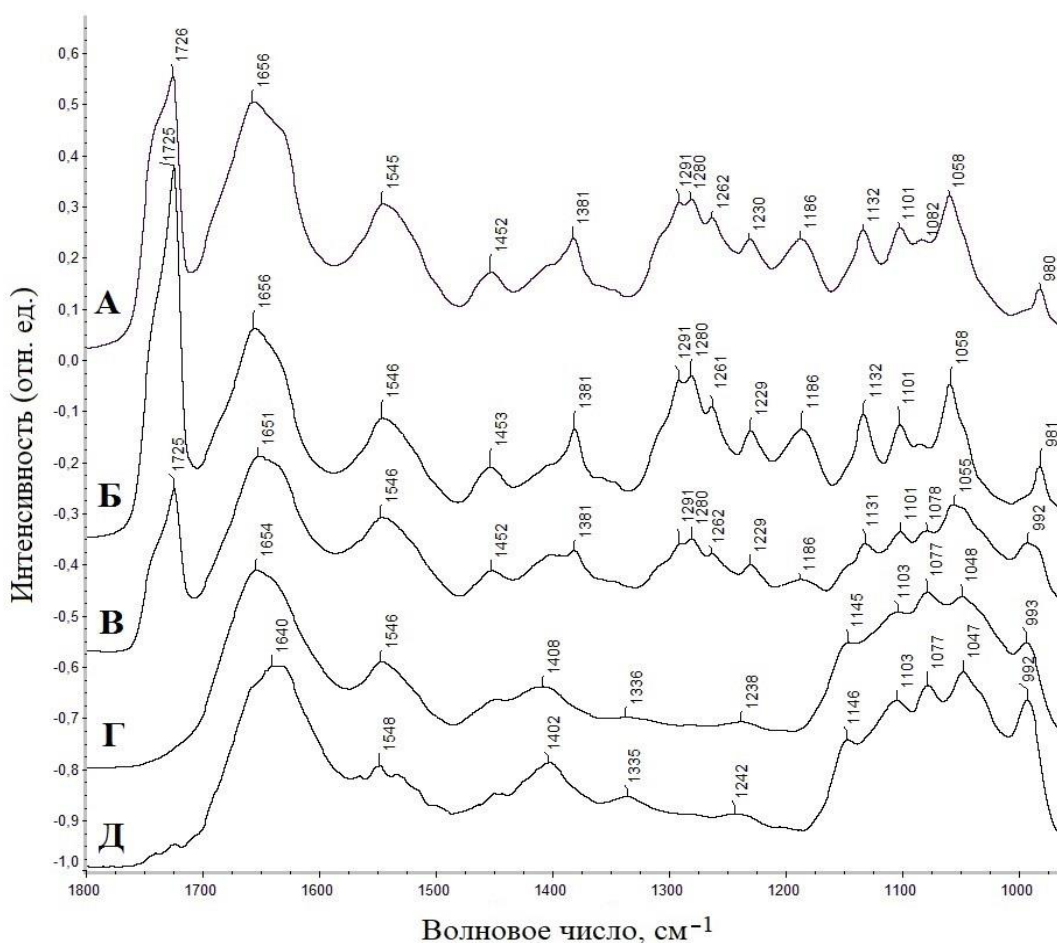
Синтез ПГБ на ранних сроках культивирования был зафиксирован и изучен для штамма *A. brasilense* Cd. Для него было обнаружено, что полимер накапливался до 40% от сухого веса клеточной массы уже на 1 сут культивирования при добавлении в среду 0,106 г/л NH_4Cl [115]. Важно отметить, что при инкубировании в фосфатном буфере (т.е. в условиях голодания), выживаемость бактерий, содержащих около 40% ПГБ (от сухой биомассы), была выше, чем у клеток, содержащих около 5% ПГБ [115]. Также было изучено влияние различных источников углерода на интенсивность синтеза ПГБ штаммом *A. brasilense* Cd [261]. Максимальные количества ПГБ (88,6% от сухой массы клеток) синтезировались при добавлении в среду малата на поздней логарифмической и стационарной фазах роста (18–24 ч роста). Источник связанного азота (NH_4Cl) в среду добавлялся в количестве 0,52 г/л (C:N = 15:1), т.е. синтез происходил в оптимальных трофических условиях на поздних сроках культивирования. Отметим, что эти данные [261] следует воспринимать с осторожностью, поскольку столь высокий уровень накопления ПГБ (>88% сухой биомассы) при существенном содержании NH_4Cl (0,52 г/л) плохо согласуется даже с предыдущими работами той же группы [115].

Таким образом, на основе имеющейся информации, в исследовании использовали следующие концентрации связанного азота (NH_4Cl): 0,1, 0,21 и 0,33 – трофический стресс разной степени интенсивности; 0,5 – стандартные условия (оптимальные трофические условия, контроль). Культуры бактерий выращивали в течение 8 сут, измерения проводили после 1, 2, 3, 6 и 8 сут роста.

Метод ИКФС хорошо показал себя при идентификации внутриклеточного ПГБ *in situ* (как есть, без выделения из клеток), а также при анализе его относительного содержания, что объясняется тем, что на ИК-спектрах ПГБ дает

ряд характерных полос, из которых наиболее интенсивная полоса, соответствующая валентным колебаниям карбонильной группы $\nu(\text{C}=\text{O})$, не пересекается с полосами других макрокомпонентов бактериальной клетки.

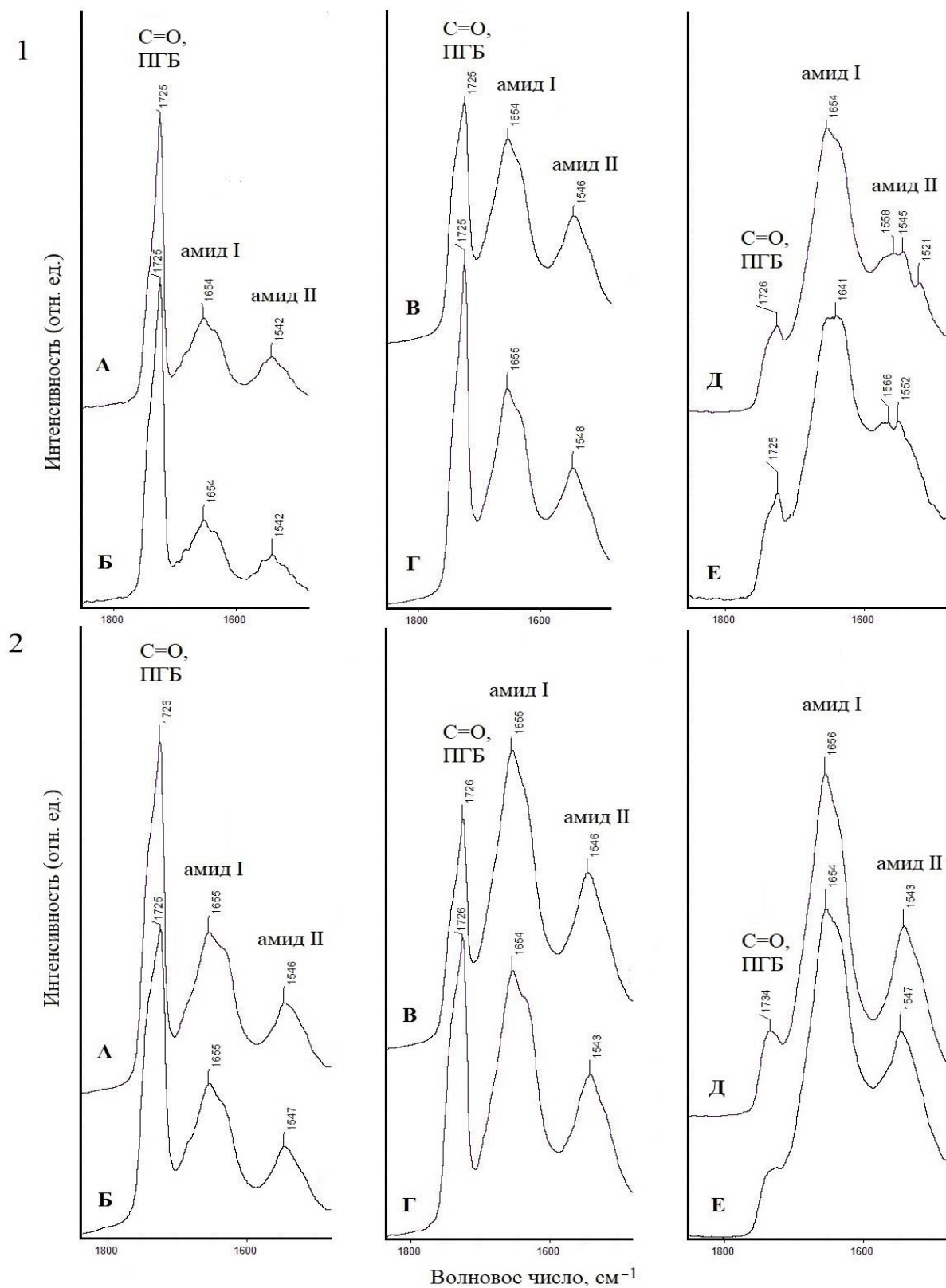
Так, на Рисунке 17, показаны ИК-спектры (информативная область 1800–900 см^{-1}) образцов *A. brasilense* Sp7, культивируемых от 1 до 8 сут в присутствии 0,21 г/л NH_4Cl .



А – 1 сут; Б – 2 сут; В – 3 сут; Г – 6 сут; Д – 8 сут

Рисунок 17 – ИК-спектры сухой биомассы штамма *A. brasilense* Sp7, при культивировании в течение до 8 сут в присутствии 0,21 г/л NH_4Cl в среде

Далее на Рисунке 18 показана наиболее информативная область ИК-спектра (1800 – 1450 см^{-1}) для каждого из трех изучаемых штаммов (*A. brasilense* Sp7, Cd и *A. baldaniorum* Sp245), культивируемых на 2 и 3 сут в присутствии 0,1 и 0,21 г/л NH_4Cl .



ИК-спектры трех штаммов, культивируемых: 1 – при 0,1 г/л NH_4Cl ; 2 – при 0,21 г/л NH_4Cl ;

А, Б – *A. brasilense* Sp7; В, Г – *A. brasilense* Cd, Д, Е – *A. baldaniorum* Sp245;

А, В, Д – в течение 2 сут; Б, Г, Е – в течение 3 сут

Рисунок 18 – ИК-спектры сухой биомассы бактерий штаммов *A. brasilense* Sp7, Cd и *A. baldaniorum* Sp245

Таблица 8 – Относительное содержание ПГБ в биомассе (величины β) для штаммов *A. baldaniorum* Sp245, *A. brasilense* Sp7 и *A. brasilense* Cd

Штамм	Условия роста (г/л NH ₄ Cl)	Сроки культивирования, сут				
		1	2	3	6	8
<i>A. baldaniorum</i> Sp245	0,1	0,15	0,39	0,42	–	–
	0,21	0,18	0,37	0,27	–	–
	0,33	0,22	0,29	0,21	0,13	–
	0,5	0,19	0,14	0,11	–	–
<i>A. brasilense</i> Sp7	0,1	2,13	2,20	0,94	0,11	–
	0,21	1,27	1,87	0,74	0,10	0,10
	0,33	0,92	0,53	0,21	–	–
	0,5	0,27	0,13	–	–	–
<i>A. brasilense</i> Cd	0,1	0,25	1,33	1,53	0,54	0,48
	0,21	0,25	0,79	1,15	0,10	0,11
	0,33	0,26	0,65	0,72	0,12	0,12
	0,5	0,20	0,28	0,12	–	–

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

Как видно из Таблицы 8, в большинстве случаев, в условиях недостатка связанного азота (0,1 – 0,33 г/л NH₄Cl), содержание ПГБ увеличивается после 1 и 2 сут культивирования (для штамма *A. brasilense* Cd к 3 сут).

Почти во всех вариантах для всех трех штаммов (за исключением штамма Cd при 0,1 г/л NH₄Cl), выращенных как при недостатке связанного азота, так и в оптимальных трофических условиях, наблюдалось значительное снижение интенсивности полосы $\nu(\text{C}=\text{O})$, свидетельствующей о присутствии ПГБ, вплоть до её исчезновения после 6 и 8 сут роста. Также следует отметить, что на ИК-спектрах образцов на 6 и 8 сут роста заметно некоторое усиление интенсивности полос в области 1150–1000 см⁻¹ с заметным ухудшением разрешимости полос в области амид I и амид II (Рисунок 17). Скорее всего, данные изменения вызваны

увеличением общего содержания полисахаридной составляющей в клетках при длительном культивировании в условиях аэрирования [27].

Наибольшие количества ПГБ накапливались штаммом *A. brasilense* Sp7 и Cd при добавлении в среду 0,1 и 0,21 г/л NH_4Cl после 2 и 3 сут; наибольшее значение β составило 1,53 для штамма Cd (3 сут; 0,1 г/л NH_4Cl) и 2,1 – 2,2 для штамма Sp7 (1 и 2 сут; 0,1 г/л NH_4Cl). Для *A. brasilense* Sp7 значения β в целом были немного выше, чем для *A. brasilense* Cd. Накопление бóльших количеств ПГБ при трофическом стрессе штаммами *A. brasilense* Sp7 и *A. brasilense* Cd по сравнению с *A. baldaniorum* Sp245 может объясняться тем фактом, что Cd является реизолятом *A. brasilense* Sp7 [287].

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

Ранее нами было показано, что *A. brasilense* Sp7 и *A. baldaniorum* Sp245 по-разному реагируют на стресс, вызванный ТМ: штамм *A. brasilense* Sp7 накапливал ПГБ при добавлении ТМ в среду (даже при отсутствии трофического стресса), в то время как штамм *A. baldaniorum* Sp245 не накапливал ПГБ [26]. Такие значительные различия в метаболическом отклике объясняются тем, что, как недавно было показано, исследуемые два штамма *A. baldaniorum* Sp245 (ранее известный как *A. brasilense* Sp245) и *A. brasilense* Sp7 относятся к двум разным видам и имеют заметно отличающийся адаптационный потенциал [108].

На ИК-спектрах всех трех штаммов, росших при добавлении в среду 0,33 и 0,5 г/л NH_4Cl , помимо сохранения общей динамики снижения содержания внутриклеточного сложного полиэфира к поздним срокам культивирования, отмечена также малая интенсивность полосы валентных колебаний $\text{C}=\text{O}$ на всех этапах роста. Полоса представляла собой слабо выраженное плечо, и рассчитанные величины β в среднем составляли 0,3; максимальное значение составляло 0,92 для *A. brasilense* Sp7 при 0,33 г/л NH_4Cl и на 1 сут роста (Таблица 8). Таким образом, увеличение содержания связанного азота (NH_4Cl) в среде,

соответствующее снижению трофического стресса, приводило к заметному снижению накопления ПГБ при культивировании в аэробных условиях у *A. baldaniorum* и *A. brasilense*. Однако для штаммов *A. brasilense* Sp7 и Cd это снижение выражено сильнее, чем для штамма *A. baldaniorum* Sp245.

Необходимо отметить, что в упомянутой выше работе [261] было показано, что при добавлении 0,5 г/л NH_4Cl в среду *A. brasilense* Cd синтезировал большие количества ПГБ (вплоть до 88,6% от сухой биомассы, [261]), что значительно отличается не только от наших данных, но и от предшествующих данных этой же группы [115]. Подобные расхождения требуют тщательного сравнительного анализа; они могут быть вызваны как вероятными изменениями в геноме штамма, вызванными длительным периодом хранения (десятилетиями), так и разными методами измерения содержания ПГБ.

Тем не менее, полученные в нашей работе данные о динамике накопления ПГБ при 0,33 г/л NH_4Cl коррелируют с результатами работы Р. Итзигсона с соавт., где максимум накопления ПГБ так же наблюдался на 3 сут культивирования *A. brasilense* Cd (Таблица 8) [261].

Как упоминалось выше, известно, что штаммы *A. baldaniorum* Sp245 и *A. brasilense* Sp7 характеризуются различиями в метаболическом отклике на разные стрессовые условия [18, 26], поскольку занимают разные экологические ниши в ризосфере и, соответственно, обладают разными адаптивными механизмами [15, 288]. Данные различия совсем недавно получили свое объяснение – как было показано, штаммы *A. baldaniorum* Sp245 (ранее известный как *A. brasilense* Sp245) и *A. brasilense* Sp7 относятся к двум разным видам [108].

Результаты, полученные в нашей работе, соотносятся с этими данными. Три штамма реагировали по-разному на трофический стресс: *A. brasilense* Sp7 и *A. brasilense* Cd накапливали бóльшие количества ПГБ по сравнению с *A. baldaniorum* Sp245. Схожая динамика синтеза ПГБ для штаммов Sp7 и Cd может быть объяснена тем фактом, что Cd является реизолятом *A. brasilense* Sp7 [197, 287], в силу чего обладает схожими защитными механизмами, несмотря на

тот факт, что *A. brasilense* Cd способен также проникать в кортикальные межклеточные пространства корня [199, 289].

Образец штамма *A. brasilense* Cd, культивируемый в оптимальных трофических условиях в течение 8 сут, был измерен на специальной полиэтиленовой подложке (Type 61 Disposable IR Cards). ИК-спектры этого образца были идентичны ИК-спектрам образцов, измеренный на подложках из ZnSe.

Как можно видеть на Рисунках 17 и 18, изменения в форме и асимметрия полосы $\nu(\text{C}=\text{O})$ в области $1750 - 1720 \text{ см}^{-1}$, относящейся к валентным колебаниям карбонильной группы сложноэфирного фрагмента макромолекулы ПГБ, зависят от времени культивирования. Для наиболее интенсивной полосы ПГБ (используемой как маркер ПГБ в бактериальных образцах) известно, что более низкочастотные значения ($\sim 1720 - 1735 \text{ см}^{-1}$) соответствуют более упорядоченным структурам, в то время как высокочастотные значения ($\sim 1745 \text{ см}^{-1}$) соответствуют аморфной составляющей [274, 278, 280, 281, 290]. Наблюдаемое явление свидетельствует о постоянных изменениях и перераспределении аморфной и упорядоченной составляющей ПГБ в бактериальных культурах в соответствии с изменениями физиологического состояния культуры. Это оправдывает выбор метода, основанного на расчете площадей полос (вместо использовавшихся до этого интенсивностей полос) при анализе содержания ПГБ в сухой биомассе, предложенного в данной работе.

Методом ИКФС проведен мониторинг накопления ПГБ штаммами видов *A. baldaniorum* и *A. brasilense* и его изменений в ходе культивирования при трофическом стрессе различной интенсивности без дополнительных стадий выделения и очистки сложного полиэфира. Были показаны различия в накоплении ПГБ в зависимости от исходных концентраций связанного азота в среде культивирования. Также были показаны различия для штаммов двух разных видов, занимающих разные экологические ниши и, следовательно, обладающих различиями в их адаптивных стратегиях [98, 291].

Поскольку накопление ПГБ является свойством, полезным для выживания бактерий в неблагоприятных условиях [14, 273, 290, 292–295], полученные результаты, помимо их фундаментального интереса и новизны, могут иметь важное значение в агробиотехнологической практике, поскольку понимание механизмов адаптивных стратегий позволяет проводить более удачный подбор штаммов, используемых в качестве биоудобрений, для создания которых активно используются в том числе и различные штаммы видов *A. brasilense* и *A. baldaniorum* [19].

3.3 Изучение планктонных культур и биопленок бактерий вида *A. baldaniorum*

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

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

На первом этапе работы с помощью ИКФС был проведен сравнительный анализ зрелых биопленок (5 сут), его матрикса и отдельных клеток, полученных путем центрифугирования. Все три ИК-спектра имели характерную для бактериальных образцов форму; как можно видеть на Рисунке 19, ИК-спектр биопленки слабо отличался от измеренных ИК-спектров образцов выделенных клеток и МБ, что указывает на аналогичное соотношение макрокомпонентов – белков, углеводов и др. – в их составе (Таблица 9). Отличия на измеренных ИК-спектрах наблюдались лишь в области полосы при 1730 см^{-1} , соответствующей валентным колебаниям функциональной группы С=О (маркер ПГБ). На ИК-спектре отдельных клеток полоса $\nu(\text{C}=\text{O})$ обладала наибольшей интенсивностью, чем таковая на ИК-спектрах биопленки и матрикса.

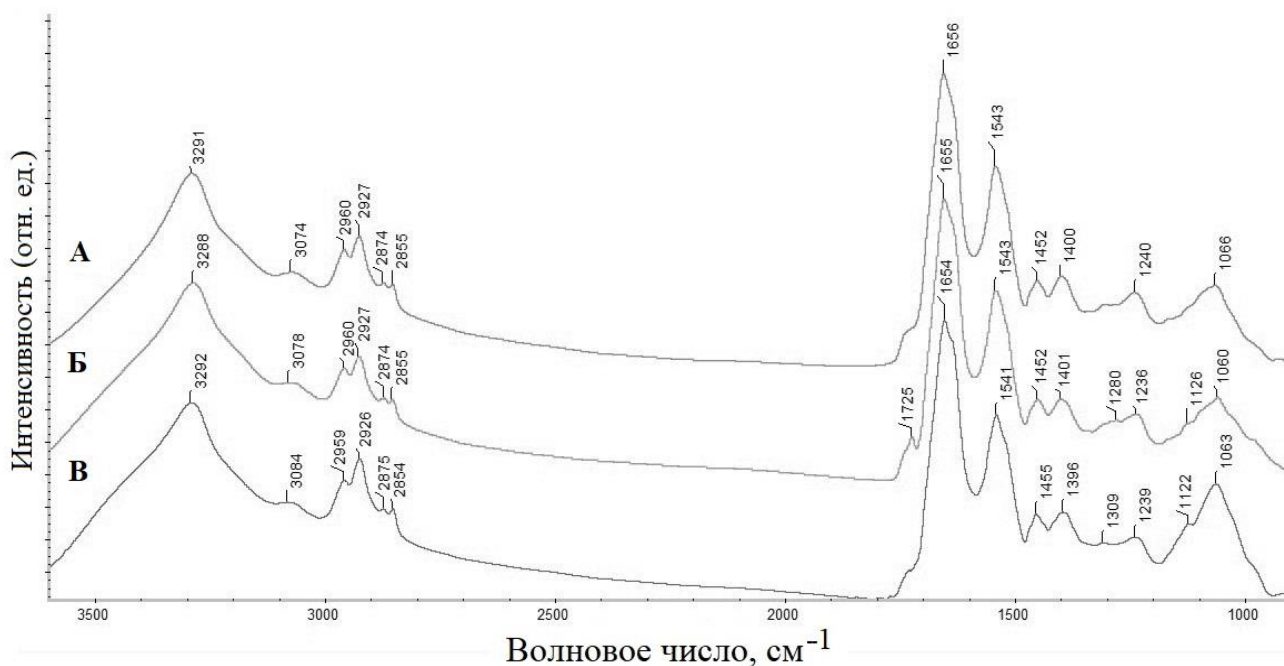


Рисунок 19 – ИК-спектры образцов биопленки, образованной бактериями штамма *A. baldaniorum* Sp245 (А), выделенных из биопленки клеток (Б) и матрикса биопленки (В)

Большую интенсивность полосы $\nu(\text{C}=\text{O})$ (по сравнению с ИК-спектром биопленки) можно связать с удалением из образца матрикса, на ИК-спектре которого, как видно на Рисунке 19В, полоса $\nu(\text{C}=\text{O})$ минимальна по интенсивности.

Фракции с различными молекулярными массами (МБ1 и МБ2) были получены делением МБ на колонке с носителем Sepharose CL-6В (образцы предоставлены группой биоорганической химии, лаборатория биохимии, ИБФРМ РАН).

Как можно видеть на Рисунке 20, ИК-спектры этих образцов заметно отличались друг от друга. В частности, на ИК-спектре образца МБ1 имелось два максимума 1654 и 1635 cm^{-1} , соответствующих частотам колебаний пептидных связей в белковых молекулах (полоса амид I) [56]. Различное положение максимумов полосы амид I на ИК-спектрах бактериальных клеток соответствует различным компонентам вторичной структуры белков [68].

Таблица 9 – Соотнесение полос в ИК-спектрах с различными связями в образцах биопленки, клеток и матрикса биопленок

Образец	Соотнесение с функциональными группами, см ⁻¹				
	Жирные кислоты		Амид I	Амид II	Полисахариды С–О, С–С, С–ОН, С–О–Н, С–О–С
	–СН ₃	>СН ₂			
Биопленка	2960	2927	1656	1543	1066
Клетки	2960	2927	1655	1553	1060
Матрикс биопленок	2959	2926	1654	1541	1063
МБ1	2958	2925	1654 1635	1545	1064
МБ2	2962	2933	1654	1545	1076
МБ3	2973	2933	1638	1545	1061

Полоса с частотой в 1654 см⁻¹ соответствует α -спирали, при этом появление максимума при 1635 см⁻¹ свидетельствует о присутствии в образце белковых молекул в виде β -слоев.

Для МБ2 в области полосы амид I на ИК-спектре имелся лишь один максимум с частотой 1654 см⁻¹, что соответствует конформации белкового компонента в виде доминирующей α -спирали.

Помимо различий в соотношении конформаций белковой составляющей, ИК-спектр образца МБ1 характеризовался значительно более интенсивной полосой полисахаридной составляющей (~1200–1000 см⁻¹, колебания связей С–О–С, С–О, Р=О в полисахаридах [56]) по сравнению с таковой на ИК-спектре образца МБ2, а также наличием полос, характерных для липидов (плечо ν (С=О) ок. 1740 см⁻¹ и заметно увеличенные по интенсивности полосы колебаний групп –СН₂– и –СН₃ в областях 3000–2800 (валентные) и 1453 см⁻¹ (деформационные)).

Для образцов МБ, МБ1 и МБ2 для полосы при ~1170 см⁻¹, соответствующей полисахаридам, были рассчитаны величины β . Результаты представлены в Таблице 10.

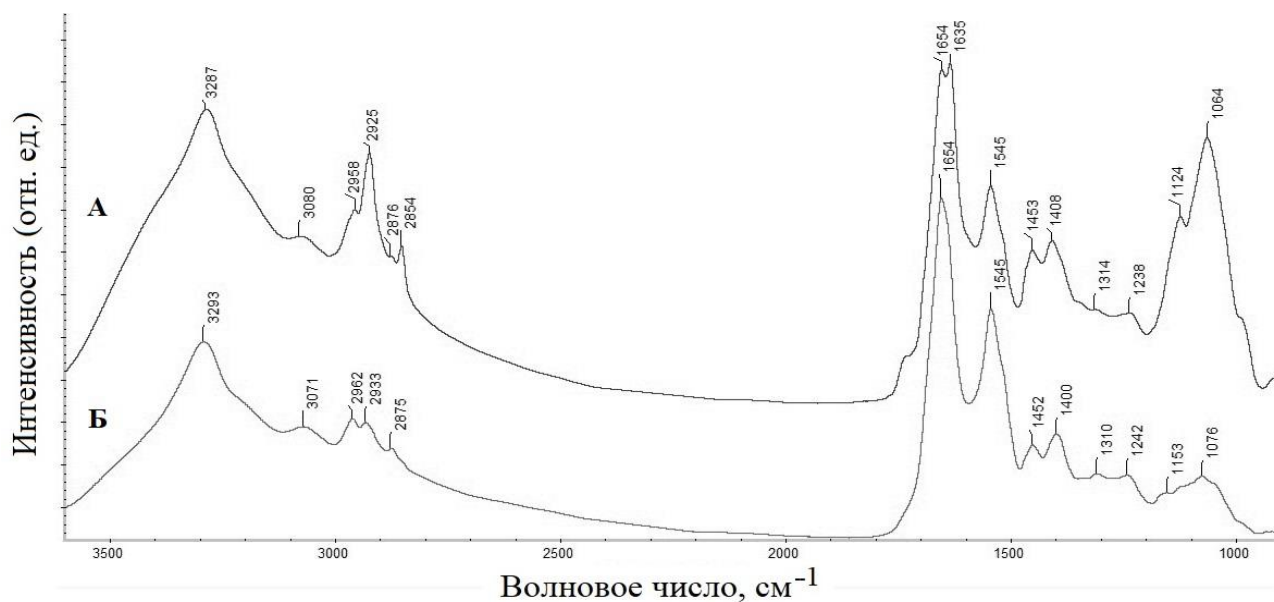


Рисунок 20 – ИК-спектры образцов МБ1 (А) и МБ2 (Б), полученных из препарата матрикса биопленки делением на хроматографической колонке

Как можно видеть, в образце МБ1 полисахаридная составляющая увеличивалась по сравнению с МБ почти в 2 раза, в то время как в случае образца МБ2 содержание полисахаридной составляющей, наоборот, сокращалось в 2 раза.

Для получения углеводных составляющих матрикса биопленки был проведен мягкий кислотный гидролиз препарата 2% АсОН при 100°C (4 ч).

Таблица 10 – Относительное содержание полисахаридной составляющей (величины β) в образцах МБ, МБ1, МБ2 и МБ3 от биопленки, образованной штаммом *A. baldaniorum* Sp245

Образцы	Величина β
МБ	1,3
МБ1	2,3
МБ2	0,6
МБ3	3,4

После центрифугирования гидролизата углеводсодержащий супернатант подвергали разделению гель-проникающей хроматографией на колонке с носителем Sephadex G-50. В результате разделения была получена высокомолекулярная фракция, обозначенная как МБЗ. На Рисунке 21 приведен ИК-спектр, измеренный с образца МБЗ.

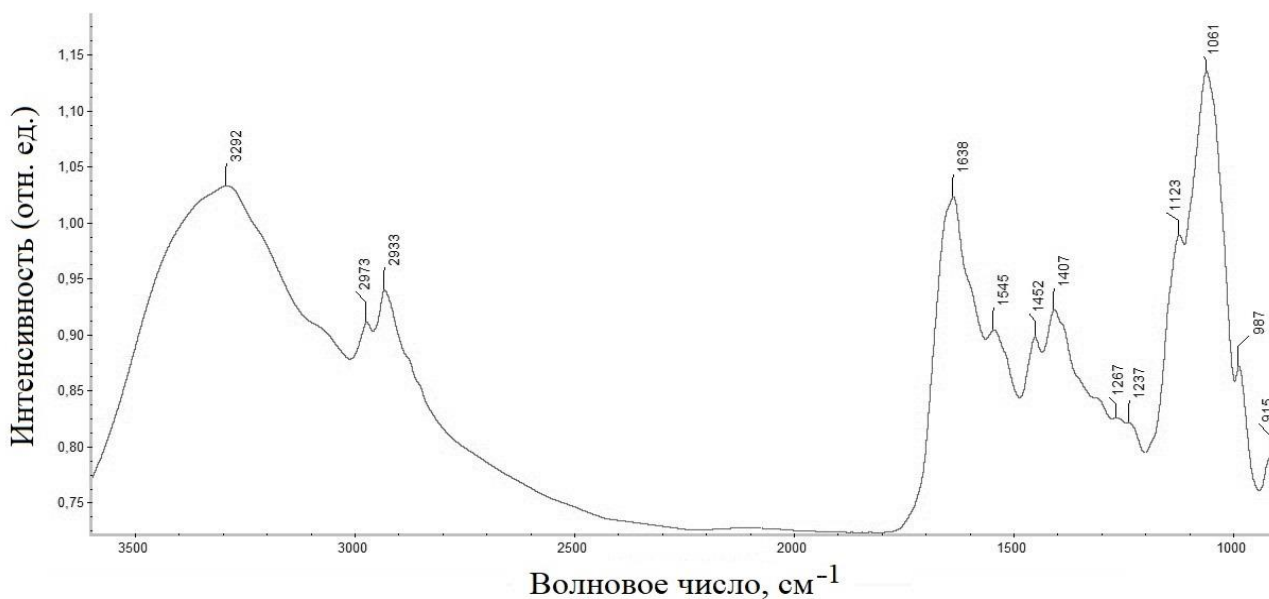


Рисунок 21 – ИК-спектр образца МБЗ, полученный из препарата матрикса биопленки делением на хроматографической колонке

Как можно видеть, на спектре имелись интенсивные полосы с максимумами при 1123 и 1061 см⁻¹, соответствующие функциональным группам С–О–С, С–О и Р=О в полисахаридах. Наряду с этими полосами на ИК-спектре также имелись четко разрешимые полосы с максимумами при 1638 см⁻¹ и 1545 см⁻¹, соответствующие амид I и амид II белковой составляющей. Рассчитанная величина β для образца МБЗ равнялась 3,4, что составило почти в 2,5 раза больше полисахаридной составляющей, чем у нативного препарата МБ.

На ИК-спектрах любых бактериальных образцов полоса амид I не перекрывается никакими другими полосами био(макро)молекул и строго соответствует пептидной связи в белковой составляющей клеток [56]. Наличие как полосы амид I, так и полосы амид II, а также соотношение их интенсивностей

на спектре образца МБЗ имеет картину, близкую к таковой именно для белковой составляющей (Рисунок 21).

Стоит отметить также, что в соответствии с литературными данными полосы основных макрокомпонентов бактериальных клеток, в том числе и белковой составляющей, вносят заметный вклад в ИК-спектр лишь в тех случаях, когда относительное содержание компонента в образце более 10% [56].

Общеизвестно, что полное расщепление пептидных связей необходимо проводить в жестких условиях (в 6 М соляной кислоте (HCl), в течение 72 ч и при температуре не ниже 105°C) [296]. Это, а также все вышесказанное позволяет предположить присутствие в образце МБЗ полипептидных остатков.

Таким образом, методом ИКФС был проведен сравнительный анализ биопленки, отделенных клеток и матрикса биопленки, а также его выделенных макрокомпонентов, без какой-либо дополнительной обработки. Данная работа показывает, что ИКФС является удобным инструментальным методом в микробиологических исследованиях для быстрого и неразрушающего анализа макрокомпонентного состава бактериальных препаратов.

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

Штаммы *A. baldaniorum* Sp245 и *A. brasilense* Sp7 относятся к наиболее изучаемым последние десятилетия представителям этих видов, что объясняется их агробιοтехнологическим потенциалом – способности к фитостимуляции растений. Большая часть исследований биопленок, образованных бактериями данного вида, связана с изучением подвижности и хемотаксиса, участия жгутиков в процессах образования биопленки, с анализом состава внеклеточного полимерного матрикса биопленок, а также воздействием внешних сигналов и их влияния на процессы формирования биопленки [246, 247, 251, 259]. При изучении макрокомпонентного состава биопленок классические методы изучения предполагают выделение одного или нескольких компонентов, вплоть

до отдельных белков, что приводит к нарушению их нативного состояния. В отличие от химических и биохимических методов, ИКФС позволяет провести анализ макрокомпонентов микробиологических образцов на молекулярном уровне без потери информации об их исходном состоянии и без их непосредственного выделения, т.е. *in situ*.

В данном разделе с применением метода ИКФС была проведена сравнительная характеристика биопленок, образованных диким штаммом *A. baldaniorum* Sp245 и его мутантом Sp245.1610. На Рисунке 22 показаны ИК-спектры образцов биопленок дикого штамма *A. baldaniorum* Sp245 (А) и его мутанта Sp245.1610 (Б).

Биопленки выращивались непосредственно на поверхности стекол из ZnSe в течение 6 сут. Такие условия культивирования выбраны с учетом того, что после 6 сут формируется зрелая биопленка, т.е. прекращается адгезия бактерий на поверхность биопленки, количество биомассы стабилизируется, а толщина становится постоянной при дальнейшем культивировании [259].

Максимумы на ИК-спектрах и их соотношение с функциональными группами в макромолекулах представлены в Таблице 11 (соотнесение выполнено по данным [27, 56, 57, 69, 297–299]). ИК-спектры 6-сут зрелых биопленок, образованных штаммом *A. baldaniorum* Sp245 и его мутантом *A. baldaniorum* Sp245.1610, представлены типичными функциональными группами, соответствующими основным бактериальным макрокомпонентам.

Различия между ИК-спектрами биопленок невелики, но визуально различимы. Прежде всего, на спектре дикого штамма (Рисунок 22) проявляется хорошо разрешенная полоса при 1732 см^{-1} , типичная для сложноэфирной группы С=О в ПГБ.

Важно отметить, что для *A. baldaniorum* была показана способность к синтезу только ПГБ, но не других ПГА [261], что позволяет идентифицировать наличие внутриклеточного ПГБ для этого вида бактерий с применением одного лишь метода ИКФС.

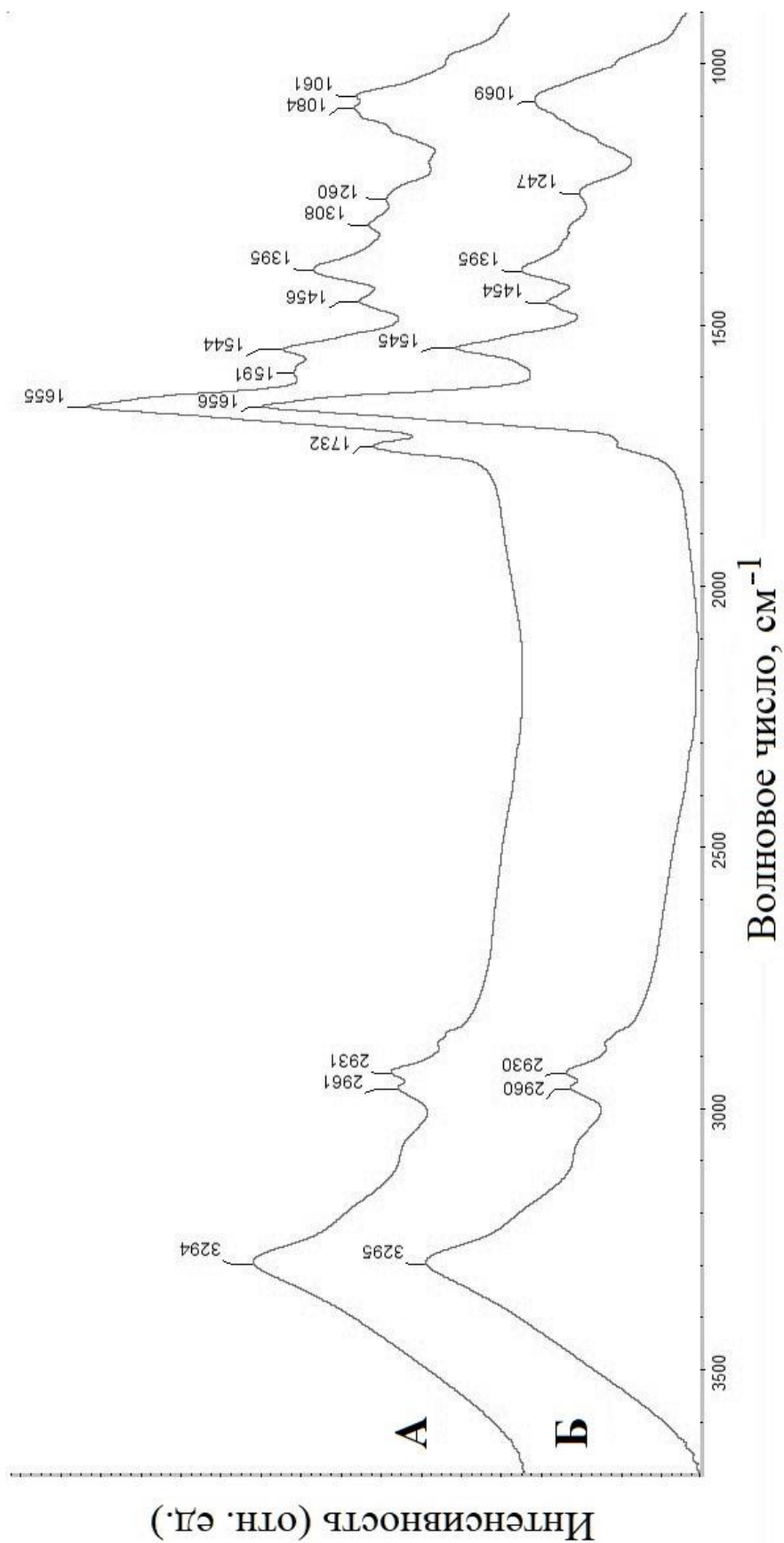


Рисунок 22 – ИК-спектры зрелой, 6-суточной биопленки, образованной штаммом *A. baldaniorum* Sp245 (А) и его мутантом *A. baldaniorum* Sp245.1610 (Б)

Таблица 11 – Соотнесение максимумов основных полос (волновые числа, см⁻¹) на ИК-спектрах образцов биопленок (6 сут), сформированных штаммами бактерий *A. baldaniorum* Sp245 и Sp245.1610, с функциональными группами [27, 56, 57, 69, 297–299]

Образец		Соотнесение основных полос с функциональными группами
<i>A. baldaniorum</i> Sp245	<i>A. baldaniorum</i> Sp245.1610	
3294	3295	О–Н; N–H, ν (амид А в белках)
2961	2960	C–H в CH ₃ , ν_{as}
2931	2930	C–H в >CH ₂ , ν_{as}
1732	пл.	C=O, ν (эфирная составляющая)
1655	1656	амид I (в белках)
1544	1545	амид II (в белках)
1456	1454	–CH ₃ , δ (в белках, жирах, сложных эфирах и др.)
1395	1395	COO ⁻ , ν_s
1309	–	C–O–C/C–C–O, ν (в сложных эфирах)
1260	1247	амид III/O–P=O, ν_{as}
1083	1069	C–O, C–C, C–OH, ν ; C–O–H, C–O–C, δ
839	841	Область «истинных отпечатков пальцев» (на Рисунке 24 не представлена, поскольку является малоинформативной)
669 620	620	

Примечание: ν – валентные колебания; ν_{as} – антисимметричные валентные колебания; δ – деформационные колебания; пл. – плечо; прочерк (–) отсутствие полосы.

В условиях трофического стресса (недостаток связанного азота) бактерии вида *A. baldaniorum* накапливают значительные количества ПГБ [18, 27]. В данном случае среда СМС содержала 0,5 г/л NH₄Cl, что соответствует

оптимальным питательным условиям для этих бактерий (Döbereiner & Day, 1976), но, тем не менее, ПГБ синтезировался в заметных количествах. Содержание ПГБ составило ~10% от сухой массы клеток (Рисунок 22).

Присутствие в клетках сложного полиэфира, вероятно, связано с длительным культивированием биопленки (6 сут), когда большая часть связанного азота уже израсходована. Данные условия являются трофическим стрессом, при котором, как известно, инициируется процесс синтеза и накопления ПГБ [14]. При этом углеродсодержащие питательные вещества в культуральной среде вполне могут быть представлены бактериальными экзополисахаридами и/или компонентами лизированных клеток [300].

Как отмечалось выше, положение максимума для полосы C=O чувствительно к степени упорядоченности ПГБ [274, 301]. Упорядоченная структура полимера характеризуется поглощением в более низкочастотном диапазоне от ~1720 до ~1735 см⁻¹; аморфная структура – в более высокочастотном диапазоне, от ~1740 до ~1750 см⁻¹ [281]. На анализируемом спектре максимум полосы C=O составляет 1732 см⁻¹, что соответствует ПГБ с относительно слабой степенью упорядоченности, типичной для внутриклеточных гранул ПГБ [281].

В отличие от дикого штамма, на ИК-спектре мутанта *A. baldaniorum* Sp245.1610 в этой области присутствовало лишь слабое плечо (Рисунке 24), что свидетельствует о накоплении заметно меньшего количества ПГБ при идентичных условиях. Помимо ПГБ, полосы в этой области также могут давать и другие клеточные эфиры, такие как липополисахариды и фосфолипиды.

Но их вклад в ИК-спектр из-за относительно малого содержания в бактериальной клетке (и невысокого относительного содержания в них сложноэфирных фрагментов) обычно несущественен и в этой области практически незаметен [13, 27, 56].

При анализе ИК-спектров используется их математическая обработка, в частности, рассчитывается вторая производная, позволяющая определить точное

положение максимумов полос, а также выявить полосы, перекрывающиеся другими, более интенсивными.

В данном эксперименте для ИК-спектров биопленок (Рисунок 22) были получены вторые производные с применением программного обеспечения OMNIC (Рисунок 23).

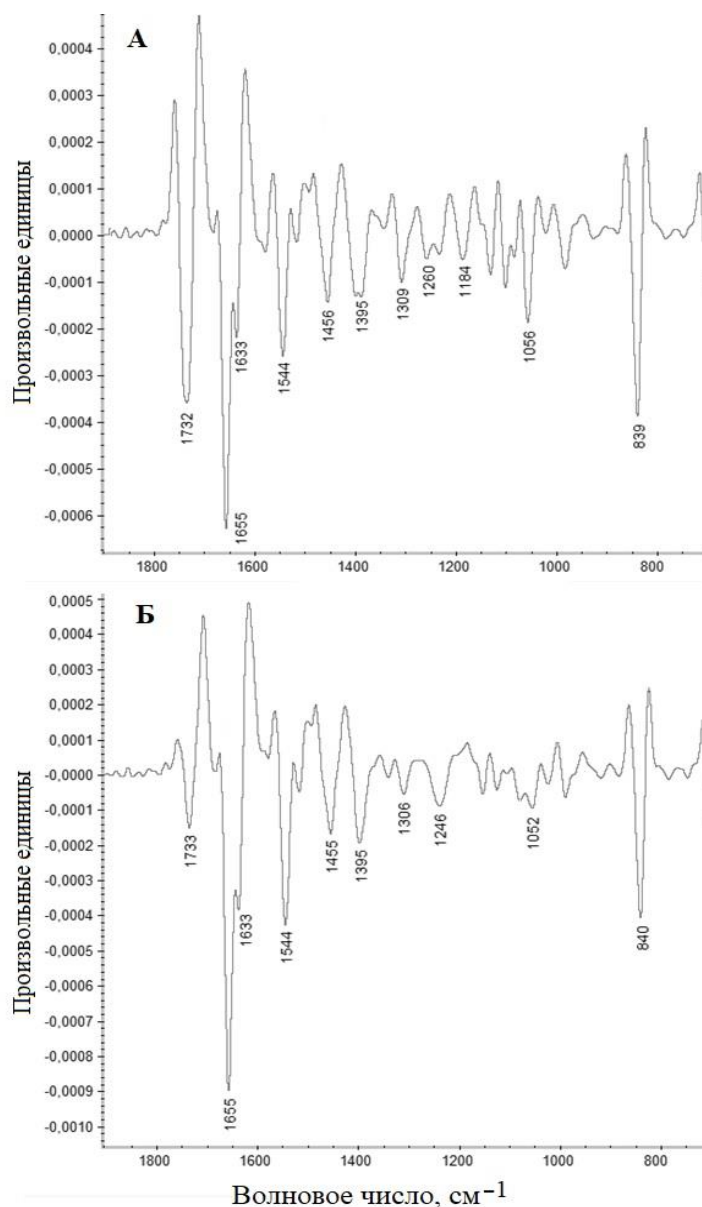


Рисунок 23 – Вторые производные ИК-фурье-спектров биопленок, образованных диким штаммом *A. baldaniorum* Sp245 (А) и штаммом-мутантом *A. baldaniorum* Sp245.1610 (Б), выращенных на поверхности стекла из ZnSe

Минимум при 1732 см^{-1} (для C=O в ПГБ) на второй производной ИК-спектра штамма *A. baldaniorum* Sp245 расположен значительно ниже (Рисунок 23А), чем для штамма-мутанта (Рисунок 23Б). Такое же соотношение интенсивности минимумов вторых производных ИК-спектров родительского штамма и штамма-мутанта наблюдается и в области при 1309 см^{-1} ($\nu(\text{C}-\text{C}-\text{O}/\text{C}-\text{O}-\text{C})$ в ПГБ) в сравнении с полосами белков (амид I при 1655 см^{-1}). Таким образом, анализ вторых производных подтвердил выявленные выше различия.

Стоит отметить, что на вторых производных ИК-спектров в области амид I, помимо основного минимума (1655 см^{-1} ; α -спирали), выявляется также минимум при 1633 см^{-1} (β -слои), что соответствует лишь визуальной различимой асимметрии полосы амид I в данной области на исходных ИК-спектрах.

Штамм-мутант *A. baldaniorum* Sp245.1610 имеет вставку Omegon Km в гене липидного метаболизма *fabG1* в плазмиде AZOBR_p1 [302] и, по сравнению со штаммом дикого типа *A. baldaniorum* Sp245, обладает сниженной способностью к формированию биопленок, иной степенью агрегации на разных этапах образования биопленки, сниженной гемагглютинирующей активностью и имеет изменения в составе ЖК [259]. Продукты гена *fabG1* не участвуют в синтезе ПГБ, но, вероятно, опосредованно влияют на процессы накопления ПГБ клетками азоспирилл, поскольку продукты расщепления ЖК участвуют в цикле синтеза ПГБ.

Таким образом, в данном исследовании впервые для бактерий рода *Azospirillum* была использована ИКФС при сравнительном изучении зрелых 6-суточных биопленок, образованных штаммом *A. baldaniorum* Sp245 и его мутантом *A. baldaniorum* Sp245.1610 [99].

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

3.3.3 Сравнительное исследование синтеза поли-3-гидроксибутирата диким штаммом *A. baldaniorum* Sp245, мутантом *A. baldaniorum* Sp245.1610 и комплементированными производными последнего

Для штамма-мутанта *A. baldaniorum* Sp245.1610 известно, что он несет мутацию в генах липидного обмена – по гену *fabG1* предполагаемой 3-оксоацил-[ацилпереносащий белок]-редуктазы, непосредственно участвующей в процессах образования ЖК [259]. Циклы синтеза и расщепления ЖК тесно связаны с метаболизмом ПГБ, поскольку одним из продуктов цикла β -окисления ЖК является ацетил-СоА, две молекулы которого конденсируются на первом этапе синтеза ПГБ [160, 172]. В исследовании, описанном ранее (пункт 3.3.2) было показано, что биопленки штамма-мутанта *A. baldaniorum* Sp245.1610 обладают сниженной способностью к синтезу ПГБ по сравнению с биопленками родительского штамма. Для более подробного изучения возможного влияния мутации по гену *fabG1* на синтез ПГБ было проведено сравнительное исследование синтеза ПГБ бактериями дикого штамма *A. baldaniorum* Sp245, его мутанта *A. baldaniorum* Sp245.1610 и производными последнего, культивируемыми в виде планктонных культур.

Рассчитанные величины β для исследуемых образцов представлены в Таблице 13. Установлено, что планктонная культура мутантного штамма *A. baldaniorum* Sp245.1610, культивируемая в жидкой среде СМС с пониженным содержанием связанного азота, синтезирует меньше ПГБ ($\beta=0,14$), чем дикий штамм *A. baldaniorum* Sp245 ($\beta=0,22$). Однако после введения в клетки штамма-мутанта как отдельно вектора pRK415, так и pRK415 с клонированными генами *fabG1*, *fabH1* или *fabG1-fabH1*, наблюдались изменения в интенсивности синтеза ПГБ. Так, при введении в клетки бактерий вектора pRK415 интенсивность синтеза ПГБ возросла практически до исходной величины ($\beta=0,20$). Заметные изменения в синтезе происходили при введении в клетки бактерий генов *fabH1*, *fabG1* и одновременно двух генов *fabG1-fabH1*, что приводило к более

заметному усилению интенсивности синтеза ПГБ ($\beta = 0,26, 0,29$ и $0,34$ соответственно). Полученные данные свидетельствуют о влиянии продуктов генов *fabG1* и *fabH1* на процесс накопления ПГБ в клетках азоспирилл.

Таблица 12 – Относительное содержание ПГБ в биомассе (величины β) для бактерий штамма *A. baldaniorum* Sp245, его мутанта *A. baldaniorum* Sp245.1610 и комплементированных производных последнего

Штамм/производный	Величина β ¹
<i>A. baldaniorum</i> Sp245	0,22
<i>A. baldaniorum</i> Sp245.1610	0,14
<i>A. baldaniorum</i> Sp245.1610(pRK415)	0,20
<i>A. baldaniorum</i> Sp245.1610(pRK415- <i>fabG1</i>)	0,29
<i>A. baldaniorum</i> Sp245.1610(pRK415- <i>fabH1</i>)	0,26
<i>A. baldaniorum</i> Sp245.1610(pRK415- <i>fabG1-fabH1</i>)	0,34

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

Таким образом, методом просвечивающей ИКФС проведено сравнительное исследование синтеза ПГБ диким штаммом *A. baldaniorum* Sp245 и его инсерционного мутанта с нарушениями в генах липидного обмена, а также производными этого мутанта, получившими соответствующие гены дикого типа в составе рекомбинантных плазмид.

В условиях, способствующих синтезу ПГБ, планктонная культура *A. baldaniorum* Sp245.1610 накапливала меньше ПГБ, чем культура дикого штамма. При анализе планктонных культур производных мутанта *A. baldaniorum* Sp245.1610 повышение накопление ПГБ зафиксировано у *A. baldaniorum* Sp245.1610(pRK415) почти до исходного уровня, характерного для дикого штамма. Все другие производные – Sp245.1610(pRK415-*fabH1*), Sp245.1610(pRK415-*fabG1*) и, в особенности, Sp245.1610(pRK415-*fabG1-fabH1*) – синтезировали еще большее количество ПГБ, что свидетельствует об участии данных генов в процессах синтеза ПГБ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные эксперименты показали важное влияние этапа пробоподготовки при измерении микробных образцов методом ИКФС. На примере планктонной культуры и биопленки, образованной бактериями рода *Azospirillum*, разработан оптимальный алгоритм пробоподготовки бактериальных образцов для измерения их методом ИКФС в режиме пропускания. Также было предложено усовершенствовать имеющийся в литературе метод определения относительного содержания внутриклеточного бактериального полимера – ПГБ. Так, расчёт проводят по соотношению не интенсивностей полос-маркеров на ИК-спектрах, а по их площади, что дает более достоверно определять относительное содержание макрокомпонента. Данные результаты позволяют создать практические основы применения метода ИКФС в режиме пропускания в микробиологических исследованиях, что крайне важно ввиду отсутствия на данный момент в литературе стандартизированных методик и алгоритмов как для пробоподготовки бактериальных образцов, так и для анализа измеряемых ИК-спектров.

Показана эффективность использования данных методик при мониторинге синтеза ПГБ у бактерий видов *A. brasilense* и *A. baldaniorum*, культивируемых в условиях трофического стресса разной степени интенсивности. Метод позволил проследить за уровнем накопления и последующего расходования внутриклеточного ПГБ клетками бактерий *in situ*. Также, с применением данных алгоритмов были показаны различия в уровне накопления сложного полиэфира у дикого штамма *A. baldaniorum* Sp245 и его штамма-мутанта; на их примере выявлено вероятное влияние генов липидного метаболизма на процессы синтеза и накопления ПГБ.

Проведенные эксперименты показали возможность эффективного использования метода ИКФС в режиме пропускания в различных биоаналитических исследованиях в микробиологии и его применимость к сложным бактериальным образцам.

ВЫВОДЫ

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

2. Образцы ПГБ характеризуются разной степенью упорядоченности в зависимости от их толщины. Повышение доли аморфной фазы в пленках с большей толщиной объясняется нарушением дальнего порядка в объеме полимера вследствие смещения его цепей относительно друг друга. Данное смещение происходит из-за нарушения слабых “структурирующих” водородных связей – $\text{CH}_3 \cdots \text{O}=\text{C} <$ между спиралями полимера в результате присутствия молекул воды, связанных водородными связями со сложноэфирными фрагментами соседних цепей биополимера.

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

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

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю к.б.н. А.В. Тугаровой и ведущему научному сотруднику лаборатории биохимии ИБФРМ РАН д.х.н., профессору А.А. Камневу – за внимание, консультации, постоянную поддержку и помощь в планировании, проведении, обсуждении и оформлении экспериментальной работы. Автор также выражает благодарность аспиранту лаборатории биохимии ИБФРМ РАН О.А. Кенжегулову за помощь в проведении ИК-фурье-спектроскопических измерений, а также сотрудникам ИБФРМ РАН: С.С. Евстигнеевой и Д.И. Мокееву – за предоставленные бактериальные образцы, к.б.н. Ю.П. Федоненко, к.х.н. В.С. Гриневу, к.б.н. Л.П. Петровой и д.б.н. А.В. Шелудько – за консультации и обсуждения при анализе результатов, полученных методом ИКФС.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АЗП – агглютинин зародышей пшеницы
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- ЖК – жирные кислоты
- ДО – диффузное отражение (DRIFT, режим измерения ИК-спектров)
- ИК – инфракрасный
- ИКФС – инфракрасная фурье-спектроскопия
- НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат
- НПВО – нарушенное полное внутреннее отражение (ATR, режим измерения ИК-спектров)
- ПГА – полигидроксиалканоаты (полигидроксиалкановые кислоты)
- ПГБ – поли-3-гидроксибутират
- СМС – синтетическая малатная солевая среда
- ТМ – тяжелые металлы
- УФ – ультрафиолетовое излучение
- ФР – физиологический раствор (0,85% водный хлорид натрия)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fischer, G. FT-IR spectroscopy as a tool for rapid identification and intra-species characterization of airborne filamentous fungi / G. Fischer, S. Braun, R. Thissen, W. Dott // J. Microbiol. Methods. – 2006. – Vol. 64. – No. 1. – P. 63–77.
2. Helm, D. Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy / D. Helm, H. Labischinski, G. Schallehn, D. Naumann // Microbiology. – 1991a. – Vol. 137. – No. 1. – P. 69–79.
3. Helm, D. Elaboration of a procedure for identification of bacteria using Fourier-Transform IR spectral libraries: a stepwise correlation approach / D. Helm, H. Labischinski, D. Naumann // J. Microbiol. Methods. – 1991b. – Vol. 14. – No. 2. – P. 127–142.
4. Kirschner, C. Classification and identification of enterococci: a comparative phenotypic, genotypic, and vibrational spectroscopic study / C. Kirschner, K. Maquelin, P. Pina, N.A. Ngo-Thi, L.P. Choo-Smith, G.D. Sockalingum, C. Sandt, D. Ami, F. Orsini, S.M. Doglia, P. Allouch, M. Mainfait, G.J. Puppels, D. Naumann // J. Clin. Microbiol. – 2001. – Vol. 39. – No. 5. – P. 1763–1770.
5. Kümmerle, M. Rapid and reliable identification of food-borne yeasts by Fourier-transform infrared spectroscopy / M. Kümmerle, S. Scherer, H. Seiler // Appl. Environ. Microbiol. – 1998. – Vol. 64. – No. 6. – P. 2207–2214.
6. Maqueln, K. Prospective study of the performance of vibrational spectroscopies for rapid identification of bacterial and fungal pathogens recovered from blood cultures / K. Maqueln, C. Kirschner, L.P. Choo-Smith, N.A. Ngo-Thi, T. Van Vreeswijk, M. Stämmeler, H.P. Endtz, H.A. Bruining, D. Naumann, G. J. Puppels // J. Clin. Microbiol. – 2003. – Vol. 41. – No. 1. – P. 324–329.
7. Naumann, D. Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy / D. Naumann // Nature. – 1991. – Vol. 351. – No. 6321. – P. 81–82.
8. Naumann, D. FT-infrared and FT-Raman spectroscopy in biomedical research / D. Naumann // Appl. Spectrosc. Rev. – 2001. – Vol. 36. – No. 2–3. – P. 239–298.
9. Adt, I. FTIR spectroscopy as a potential tool to analyse structural modifications during morphogenesis of *Candida albicans* / I. Adt, D. Toubas, J.M. Pinon, M. Manfait, G.D. Sockalingum // Arch. Microbiol. – 2006. – Vol. 185. – P. 277–285.

10. Roscini, L. Influence of cell geometry and number of replicas in the reproducibility of whole cell FTIR analysis / L. Roscini, L. Corte, L. Antonielli, P. Rellini, F. Fatichenti, G. Cardinali // *Analyst*. – 2010. – Vol. 135. – No. 8. – P. 2099–2105.
11. Corte, L. FTIR metabolomic fingerprint reveals different modes of action exerted by structural variants of *n*-alkyltropinium bromide surfactants on *Escherichia coli* and *Listeria innocua* cells / L. Corte, M. Tiecco, L. Roscini, S. De Vincenzi, C. Colabella, R. Germani, C. Tascini, G. Cardinali // *PloS One*. – 2015. – Vol. 10. – No. 1. – A. e0115275.
12. Kamnev, A.A. Fourier transform infrared spectroscopic characterisation of heavy metal-induced metabolic changes in the plant-associated soil bacterium *Azospirillum brasilense* Sp7 / A.A. Kamnev, L.P. Antonyuk, A.V. Tugarova, P.A. Tarantilis, M.G. Polissiou, P.H.E. Gardiner // *J. Mol. Struct.* – 2002. – Vol. 610. – No. 1–3. – P. 127–131.
13. Kamnev, A.A. Instrumental analysis of bacterial cells using vibrational and emission Mössbauer spectroscopic techniques / A.A. Kamnev, A.V. Tugarova, L.P. Antonyuk, P.A. Tarantilis, L.A. Kulikov, Y.D. Perfiliev, M.G. Polissiou, H.E. Gardiner // *Anal. Chim. Acta*. – 2006. – Vol. 573. – P. 445–452.
14. Kadouri, D. Ecological and agricultural significance of bacterial polyhydroxyalkanoates / D. Kadouri, E. Jurkevitch, Y. Okon, S. Castro-Sowinski // *Crit. Rev. Microbiol.* – 2005. – Vol. 31. – No. 2. – P. 55–67.
15. Assmus, B. In situ localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy / B. Assmus, P. Hutzler, G. Kirchhof, R. Amann, J.R. Lawrence, A. Hartmann // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1995. – Vol. 61. – No. 3. – P. 1013–1019.
16. Fibach-Paldi, S. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense* / S. Fibach-Paldi, S. Burdman, Y. Okon // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2012. – Vol. 326. – No. 2. – P. 99–108.
17. Камнев, А.А. Эндифитный и эпифитный штаммы *Azospirillum brasilense* по-разному отвечают на стресс, вызываемый тяжелыми металлами / А.А. Камнев, А.В. Тугарова, Л.П. Антонюк // *Микробиология*. – 2007. – Т. 76. – №. 6. – С. 908–911.

18. Kamnev, A.A. Comparing poly-3-hydroxybutyrate accumulation in *Azospirillum brasilense* strains Sp7 and Sp245: the effects of copper (II) / A.A. Kamnev, A.V. Tugarova, P.A. Tarantilis, P.H. Gardiner, M.G. Polissiou // *Appl. Soil Ecol.* – 2012. – Vol. 61. – P. 213–216.
19. Cassán, F. Everything you must know about *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond / F. Cassán, A. Coniglio, G. López, R. Molina, S. Nievas, C.L.N. de Carlan, F. Donadio, D. Torres, S. Rosas, F.O. Pedrosa, E. de Souza, M.D. Zorita, L. de-Bashan, V. Mora // *Biol. Fertil. Soils.* – 2020. – Vol. 56. – No 4. – P. 461–479.
20. Norris, K.P. Infra-red spectroscopy and its application to microbiology / K.P. Norris // *Epidemiol. Infect.* – 1959. – Vol. 57. – No. 3. – P. 326–345.
21. Riddle, J.W. Bacterial identification by infrared spectrophotometry / J.W. Riddle, P.W. Kabler, B.A. Kenner, R.H. Bordner, S.W. Rockwood, H.J. Stevenson // *J. Bacteriol.* – 1956. – Vol. 72. – No. 5. – P. 593–603.
22. Feng, B. FTIR-assisted MALDI-TOF MS for the identification and typing of bacteria / B. Feng, H. Shi, F. Xu, F. Hu, J. He, H. Yang, C. Ding, W. Chen, S. Yu // *Anal. Chim. Acta.* – 2020. – Vol. 1111. – P. 75–82.
23. Zarnowiec, P. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) as a tool for the identification and differentiation of pathogenic bacteria / P. Zarnowiec, L. Lechowicz, G. Czerwonka, W. Kaca // *Curr. Med. Chem.* – 2015. – Vol. 22. – No. 14. – P. 1710–1718.
24. Harz, M. Vibrational spectroscopy – A powerful tool for the rapid identification of microbial cells at the single-cell level / M. Harz, P. Rösch, J. Popp // *Cytom. Part A: J. Int. Soc. Anal. Cytol.* – 2009. – Vol. 75. – No. 2. – P. 104–113.
25. Naumann, D. The ultra rapid differentiation and identification of pathogenic bacteria using FT-IR techniques / D. Naumann // *Fourier and Computerized Infrared Spectroscopy.* – International Society for Optics and Photonics, 1985. – Vol. 553. – P. 268–269.
26. Kamnev, A.A. Effects of heavy metals on plant-associated rhizobacteria: comparison of endophytic and non-endophytic strains of *Azospirillum brasilense* / A.A. Kamnev, A.V. Tugarova, L.P. Antonyuk, P.A. Tarantilis, M.G. Polissiou, P.H. Gardiner // *J. Trace Elem. Med Biol.* – 2005. – Vol. 19. – No. 1. – P. 91–95.
27. Kamnev, A.A. Responses of *Azospirillum brasilense* to nitrogen deficiency and to wheat lectin: a diffuse reflectance infrared Fourier transform

(DRIFT) spectroscopic study / A.A. Kamnev, J.N. Sadovnikova, P.A. Tarantilis, M.G. Polissiou, L.P. Antonyuk // *Microb. Ecol.* – 2008. – Vol. 56. – No. 4. – P. 615–624.

28. Huang, F. Heavy metal bioaccumulation and cation release by growing *Bacillus cereus* RC-1 under culture conditions / F. Huang, Z.H. Wang, Y.X. Cai, S.H. Chen, J.H. Tian, K.Z. Cai // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* – 2018. – Vol. 157. – P. 216–226.

29. Ding, P. Influence of Zn(II) stress-induction on component variation and sorption performance of extracellular polymeric substances (EPS) from *Bacillus vallismortis* / P. Ding, W. Song, Z. Yang, J. Jian // *Bioprocess Biosyst. Eng.* – 2018. – Vol. 41. – No. 6. – P. 781–791.

30. Fang, F.C. Bacterial stress responses during host infection / F.C. Fang, E.R. Frawley, T. Tapscott, A. Vázquez-Torres // *Cell Host Microbe.* – 2016. – Vol. 20. – No. 2. – P. 133–143.

31. Nichols, P. Fourier transform-infrared spectroscopic methods for microbial ecology: analysis of bacteria–polymer mixtures and biofilms / P. Nichols, J. Henson, J. Guckert, D.E. Nivens, D.C. White // *J. Microbiol. Methods.* – 1985. – Vol. 4. – P. 79–94.

32. Bosch, A. Characterization of *Bordetella pertussis* growing as biofilm by chemical analysis and FT-IR spectroscopy / A. Bosch, D. Serra, C. Prieto, J. Schmitt, D. Naumann, O. Yantorno // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2006. – Vol. 71. – No. 5. – P. 736–747.

33. Elzinga, E.J. ATR-FTIR spectroscopy study of the influence of pH and contact time on the adhesion of *Shewanella putrefaciens* bacterial cells to the surface of hematite / E.J. Elzinga, J.H. Huang, J. Chorover, R. Kretzschmar // *Environ. Sci. Technol.* – 2012. – Vol. 46. – No. 23. – P. 12848–12855.

34. Nivens, D.E. Role of alginate and its O acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms / D.E. Nivens, D.E. Ohman, J. Williams, M.J. Franklin // *J. Bacteriol.* – 2001. – Vol. 183. – No. 3. – P. 1047–1057.

35. Kang, S.Y. Monitoring metal ion binding in single-layer *Pseudomonas aeruginosa* biofilms using ATR-IR spectroscopy / S.Y. Kang, P.J. Bremer, K.W. Kim, A.J. McQuillan // *Langmuir.* – 2006. – Vol. 22. – No. 1. – P. 286–291.

36. Ojeda, J.J. Analysis of bacteria on steel surfaces using reflectance micro-Fourier transform infrared spectroscopy / J.J. Ojeda, M.E. Romero-González, S.A. Banwart // *Anal. Chem.* – 2009. – Vol. 81. – No. 15. – P. 6467–6473.

37. Jackson, M. The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure / M. Jackson, H.H. Mantsch // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* – 1995. – Vol. 30. – No. 2. – P. 95–120.
38. Kim, H. Infrared probes for studying the structure and dynamics of biomolecules / H. Kim, M. Cho // *Chem. Rev.* – 2013. – Vol. 113. – P. 5817–5847.
39. Tidy, R.J. FTIR studies of the similarities between pathology induced protein aggregation *in vivo* and chemically induced protein aggregation *ex vivo* / R.J. Tidy, V. Lam, N. Fimognari, J.C. Mamo, M.J. Hackett // *Vib. Spectrosc.* – 2017. – Vol. 91. – P. 68–76.
40. De Meutter, J. FTIR imaging of protein microarrays for high throughput secondary structure determination / J. De Meutter, E. Goormaghtigh // *Anal. Chem.* – 2021. – Vol. 93. – No. 8. – P. 3733–3741.
41. Troullier, A. Transient non-native secondary structures during the refolding of α -lactalbumin detected by infrared spectroscopy / A. Troullier, D. Reinstädler, Y. Dupont, D. Naumann, V. Forge // *Nat. Struct. Biol.* – 2000. – Vol. 7. – P. 78–86.
42. Fang, X. Chemical and biological characterization of polysaccharides from the bark of *Avicennia marina* / X. Fang, X. Yin, G. Yuan, X. Chen // *Eur. Food Res. Technol.* – 2015. – Vol. 241. – No. 1. – P. 17–25.
43. Ferro, L. Statistical methods for rapid quantification of proteins, lipids, and carbohydrates in nordic microalgal species using ATR–FTIR spectroscopy / L. Ferro, Z. Gojkovic, A. Gorzsás, C. Funk // *Molecules.* – 2019. – Vol. 24. – No. 18. – P. 3237.
44. Guo, Q. Non-starch polysaccharides from *American ginseng*: Physicochemical investigation and structural characterization / Q. Guo, S. W. Cui, J. Kang, H. Ding, Q. Wang, C. Wang // *Food Hydrocoll.* – 2015. – Vol. 44. – P. 320–327.
45. Wells Jr, H.A. An investigation of the vibrational spectra of glucose, galactose and mannose / H.A. Wells Jr, R.H. Atalla // *J. Mol. Struct.* – 1990. – Vol. 224. – P. 385–424.
46. Back, D.M. Fourier transform infrared spectroscopy as a powerful tool for the study of carbohydrates in aqueous solutions / D.M. Back, D.F. Michalska, P.L. Polavarapu // *Appl. Spectrosc.* – 1984. – Vol. 38. – No. 2. – P. 173–180.
47. Gao, J. Structural characterisation, physicochemical properties and antioxidant activity of polysaccharide from *Lilium lancifolium* Thunb / J. Gao, T.

Zhang, Z.Y. Jin, X.M. Xu, J.H. Wang, X.Q. Zha, H.Q. Chen // *Food Chem.* – 2015. – Vol. 169. – P. 430–438.

48. Łojewska, J. Cellulose oxidative and hydrolytic degradation: *In situ* FTIR approach / J. Łojewska, P. Miśkowiec, T. Łojewski, L.M. Proniewicz // *Polymer degradation and stability.* – 2005. – Vol. 88. – No. 3. – P. 512–520.

49. Tatulian, S.A. Attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy: a method of choice for studying membrane proteins and lipids / S.A. Tatulian // *Biochemistry.* – 2003. – Vol. 42. – No. 41. – P. 11898–11907.

50. Brandenburg, K. Orientation measurements on membrane systems made from lipopolysaccharides and free lipid A by FT-IR spectroscopy / K. Brandenburg, U. Seydel // *Eur. Biophys. J.* – 1988. – Vol. 16. – No. 2. – P. 83–94.

51. Brandenburg, K. Infrared spectroscopic conformational study of synthetic lipid A part structures / K. Brandenburg, S. Kusumoto, U. Seydel // *Springer, Spectroscopy of Biological Molecules: Modern Trends.* – Springer, Dordrecht, 1997. – P. 329–330.

52. Żarnowiec, P. Fourier transform infrared spectroscopy as a tool in analysis of *Proteus mirabilis* endotoxins / P. Żarnowiec, G. Czerwonka, W. Kaca // *Microbial Toxins.* – Humana Press, New York, 2017. – P. 113–124.

53. Schleicher, E. Light-induced reactions of *Escherichia coli* DNA photolyase monitored by Fourier transform infrared spectroscopy / E. Schleicher, B. Heßling, V. Illarionova, A. Bacher, S. Weber, G. Richter, K. Gerwert // *FEBS J.* – 2005. – Vol. 272. – No. 8. – P. 1855–1866.

54. Hu, C. Photocatalytic degradation of pathogenic bacteria with AgI/TiO₂ under visible light irradiation / C. Hu, J. Guo, J. Qu, X. Hu // *Langmuir.* – 2007. – Vol. 23. – No. 9. – P. 4982–4987.

55. Hu, X. Effect of ultra-strong static magnetic field on bacteria: Application of Fourier-transform infrared spectroscopy combined with cluster analysis and deconvolution / X. Hu, Z. Qiu, Y. Wang, Z. She, G. Qian, Z. Ren // *Bioelectromagnetics.* – 2009. – Vol. 30. – No. 6. – P. 500–507.

56. Lasch, P. Infrared spectroscopy in microbiology. *Encyclopedia of analytical chemistry: applications, theory and instrumentation* / P. Lasch, D. Naumann // John Wiley & Sons, Chichester, UK, 2015. – P. 1–32.

57. Beekes, M. Analytical applications of Fourier transform-infrared (FT-IR) spectroscopy in microbiology and prion research / M. Beekes, P. Lasch, D. Naumann // *Vet. Microbiol.* – 2007. – Vol. 123. – No. 4. – P. 305–319.

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

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

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

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

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

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

64. Helm, D. Identification of some bacterial cell components by FT-IR spectroscopy / D. Helm, D. Naumann // FEMS Microbiol. Lett. – 1995. – Vol. 126. – No. 1. – P. 75–79.

65. Sandt, C. Use of Fourier-transform infrared spectroscopy for typing of *Candida albicans* strains isolated in intensive care units / C. Sandt, G.D. Sockalingum, D. Aubert, H. Lapan, C. Lepouse, M. Jaussaud, A. Leon, J.M. Pinon, M. Manfait, D. Toubas // J. Clin. Microbiol. – 2003. – Vol. 41. – No. 3. – P. 954–959.

66. Baker, M.J. Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials / M.J. Baker, J. Trevisan, P. Bassan, R. Bhargava, H.J. Butler, K.M. Dorling, P.R. Fielden, S.W. Fogarty, N.J. Fullwood, K.A. Heys, C. Hughes, P.

Lasch, P.L. Martin-Hirsch, B. Obinaju, G.D. Sockalingum, J. Sulé-Suso, R.J. Strong, M.J. Walsh, B.R. Wood, P. Gardner, F. L. Martin // *Nat. Protoc.* – 2014. – Vol. 9. – No. 8. – P. 1771.

67. Williams, S. Fast events in protein folding: helix melting and formation in a small peptide / S. Williams, T.P. Causgrove, R. Gilmanshin, K.S. Fang, R.H. Callender, W.H. Woodruff, R.B. Dyer // *Biochemistry.* – 1996. – Vol. 35. – P. 691–697.

68. Arrondo, J.L.R. Quantitative studies of the structure of proteins in solution by Fourier-transform infrared spectroscopy / J.L.R. Arrondo, A. Muga, J. Castresana, F.M. Goni // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* – 1993. – Vol. 59. – P. 23–56.

69. Barth, A. Infrared spectroscopy of proteins / A. Barth // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2007. – Vol. 1767. – P. 1073–1101.

70. Jung, C. Insight into protein structure and protein–ligand recognition by Fourier transform infrared spectroscopy / C. Jung // *J. Mol. Recognit.* – 2000. – Vol. 13. – P. 325–351.

71. Нельсон, Д.Л. Основы биохимии Ленинджера / Д.Л. Нельсон, М.М. Кокс, А. Ленинджер // М.: БИНОМ, Лаборатория знаний, 2012. – Т.1. – С. 175.

72. Miller, L.M. FTIR spectroscopic imaging of protein aggregation in living cells / L.M. Miller, M.W. Bourassa, R.J. Smith // *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* – 2013. – Vol. 1828. – No. 10. – P. 2339–2346.

73. Kollman, P.A. Theory of the hydrogen bond / P.A. Kollman, L.C. Allen // *Chem. Rev.* – 1972. – Vol. 72. – No. 3. – P. 283–303.

74. Desiraju G.R., Steiner T. The weak hydrogen bond: in structural chemistry and biology. – International Union of Crystal, 2001. – Vol. 9.

75. Buckingham, A.D. The hydrogen bond / A.D. Buckingham, J.E. Del Bene, S.A.C. McDowell // *Chem. Phys. Lett.* – 2008. – Vol. 463. – No. 1–3. – P. 1–10.

76. Chirgadze, Yu.N. Infrared spectra and resonance interaction of amide-I vibration of the antiparallel-chain pleated sheet / Yu.N. Chirgadze, N.A. Nevskaya // *Biopolymers.* – 1976. – Vol. 15. – P. 607–625.

77. Anderle, G. Thermal denaturation of globular proteins. Fourier transform-infrared studies of the amide III spectral region / G. Anderle, R. Mendelsohn // *Biophys. J.* – 1987. – Vol. 52. – P. 69–74.

78. Bandekar, J. Amide modes and protein conformation / J. Bandekar // *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol.* – 1992. – Vol. 1120. – No. 2. – P. 123–143.

79. Krimm, S. Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides and proteins / S. Krimm, J. Bandekar // *Adv. Protein Chem.* – 1986. – Vol. 38. – P. 181–364.
80. Wiercigroch, E. Raman and infrared spectroscopy of carbohydrates: A review / E. Wiercigroch, E. Szafraniec, K. Czamara, M.Z. Pacia, K. Majzner, K. Kochan, A. Kaczor, M. Baranska, K. Malek // *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* – 2017. – Vol. 185. – P. 317–335.
81. Zhibankov, R.G. Fourier transform IR and Raman spectroscopy and structure of carbohydrates / R.G. Zhibankov, V.M. Andrianov, M.K. Marchewka // *J. Mol. Struct.* – 1997. – Vol. 436. – P. 637–654.
82. Spedding, H. Infrared spectroscopy and carbohydrate chemistry / H. Spedding // *Adv. Carbohydr. Chem.* – Academic Press, 1964. – Vol. 19. – P. 23–49.
83. Huang, H. Structural and physical properties of sanxan polysaccharide from *Sphingomonas sanxanigenens* / H. Huang, M. Wu, H. Yang, X. Li, M. Ren, G. Li, T. Ma // *Carbohydr. Polym.* – 2016. – Vol. 144. – P. 410–418.
84. Mathlouthi, M. Vibrational spectra of carbohydrates / M. Mathlouthi, J.L. Koenig // *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* – 1987. – Vol. 44. – P. 7–89.
85. Caccamo, M.T. Thermal properties of an exopolysaccharide produced by a marine thermotolerant *Bacillus licheniformis* by ATR-FTIR spectroscopy / M.T. Caccamo, C. Gugliandolo, V. Zammuto, S. Magazù // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2020. – Vol. 145. – P. 77–83.
86. Adesulu-Dahunsi, A.T. Extracellular polysaccharide from *Weissella confusa* OF126: Production, optimization, and characterization / A.T. Adesulu-Dahunsi, A.I. Sanni, K. Jeyaram, J.O. Ojediran, A.O. Ogunsakin, K. Banwo // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2018. – Vol. 111. – P. 514–525.
87. Palaniyandi, S.A. Functional characterization of an exopolysaccharide produced by *Bacillus sonorensis* MJM60135 isolated from Ganjang / S.A. Palaniyandi, K. Damodharan, J.W. Suh, S.H. Yang // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 2018. – Vol. 28. – No. 5. – P. 663–670.
88. Shen, L. Characterization of extracellular polysaccharide/protein contents during the adsorption of Cd (II) by *Synechocystis sp.* PCC6803 / L. Shen, Z. Li, J. Wang, A. Liu, Z. Li, R. Yu, X. Wu, Yu. Liu, J. Li, W. Zeng // *Environ. Sci. Pollut. Res.* – 2018. – Vol. 25. – No. 21. – P. 20713–20722.
89. Guo, Q. Extraction, fractionation and physicochemical characterization of water-soluble polysaccharides from *Artemisia sphaerocephala* Krasch seed / Q. Guo,

S.W. Cui, Q.I. Wang, X. Hu, Q. Guo, J.I. Kang, R. Yada // *Carbohydr. Polym.* – 2011. – Vol. 86. – No. 2. – P. 831–836.

90. Hajji, M. Structural characterization, antioxidant and antibacterial activities of a novel polysaccharide from *Periploca laevigata* root barks / M. Hajji, M. Hamdi, S. Sellimi, G. Ksouda, H. Laouer, S. Li, M. Nasri // *Carbohydr. Polym.* – 2019. – Vol. 206. – P. 380–388.

91. Brandenburg, K. Orientation measurements on ordered multibilayers of phospholipids and sphingolipids from synthetic and natural origin by ATR Fourier transform infrared spectroscopy / K. Brandenburg, U. Seydel // *Z. Naturforsch. C.* – 1986. – Vol. 41. – No. 4. – P. 453–467.

92. Wenning, M. Identification of microorganisms by FTIR spectroscopy: perspectives and limitations of the method / M. Wenning, S. Scherer // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2013. – Vol. 97. – No. 16. – P. 7111–7120.

93. Ngo-Thi, N.A. Characterization and identification of microorganisms by FT-IR microspectrometry / N.A. Ngo-Thi, C. Kirschner, D. Naumann // *J. Mol. Struct.* – 2003. – Vol. 661–662. – P. 371–380.

94. Oberreuter, H. Identification of coryneform bacteria and related taxa by Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy / H. Oberreuter, H. Seiler, S. Scherer // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2002. – Vol. 52. – No. 1. – P. 91–100.

95. Rebuffo, C.A. Reliable and rapid identification of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* species by artificial neural network-based Fourier transform infrared spectroscopy / C.A. Rebuffo, J. Schmitt, M. Wenning, F. von Stetten, S. Scherer // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2006. – Vol. 72. – No. 2. – P. 994–1000.

96. Tintelnot, K. Evaluation of phenotypic markers for selection and identification of *Candida dubliniensis* / K. Tintelnot, G. Haase, M. Seibold, F. Bergmann, M. Staemmler, T. Franz, D. Naumann // *J. Clin. Microbiol.* – 2000. – Vol. 38. – No. 4. – P. 1599–1608.

97. Udelhoven, T. Development of a hierarchical classification system with artificial neural networks and FT-IR spectra for the identification of bacteria / T. Udelhoven, D. Naumann, J. Schmitt // *Appl. Spectrosc.* – 2000. – Vol. 54. – No. 10. – P. 1471–1479.

98. Tugarova, A.V. Poly-3-hydroxybutyrate synthesis by different *Azospirillum brasilense* strains under varying nitrogen deficiency: A comparative in-situ FTIR spectroscopic analysis / A.V. Tugarova, Yu.A. Dyatlova, O.A. Kenzhegulov,

A.A. Kamnev // Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc. – 2021. – Vol. 252. – P. 119458.

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

100. Li, Q. Mechanical and chemical studies on EPS from *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*: from planktonic to biofilm cells / Q. Li, W. Sand // Colloids Surf. B. – 2017. – Vol. 153. – P. 34–40.

101. Lorite, G.S. The role of conditioning film formation and surface chemical changes on *Xylella fastidiosa* adhesion and biofilm evolution / G.S. Lorite, C.M. Rodrigues, A.A. De Souza, C. Kranz, B. Mizaikoff, M.A. Cotta // J. Colloid Interface Sci. – 2011. – Vol. 359. – No. 1. – P. 289–295.

102. Lugtenberg, B. Plant-growth-promoting rhizobacteria / B. Lugtenberg, F. Kamilova // Ann. Rev. Microbiol. – 2009. – Vol. 63. – P. 541–556.

103. Ewert, M. Bacterial responses to fluctuations and extremes in temperature and brine salinity at the surface of Arctic winter sea ice / M. Ewert, J.W. Deming // FEMS Microbiol. Ecol. – 2014. – Vol. 89. – No. 2. – P. 476–489.

104. Hlaing, M.M. Vibrational spectroscopy combined with transcriptomic analysis for investigation of bacterial responses towards acid stress / M.M. Hlaing, B.R. Wood, D. McNaughton, J.I. Rood, E.M. Fox, M.A. Augustin // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2018. – Vol. 102. – No. 1. – P. 333–343.

105. Moen, B. Explorative multifactor approach for investigating global survival mechanisms of *Campylobacter jejuni* under environmental conditions / B. Moen, A. Oust, Ø. Langsrud, N. Dorrell, G.L. Marsden, J. Hinds, A. Kohler, B.W. Wren, K. Rudi // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – Vol. 71. – No. 4. – P. 2086–2094.

106. Moen, B. Global responses of *Escherichia coli* to adverse conditions determined by microarrays and FT-IR spectroscopy / B. Moen, A.O. Janbu, S. Langsrud, Ø. Langsrud, J.L. Hobman, C. Constantinidou, A. Kohler, K. Rudi // Can. J. Microbiol. – 2009. – Vol. 55. – No. 6. – P. 714–728.

107. Oust, A. Analysis of covariance patterns in gene expression data and FT-IR spectra / A. Oust, B. Moen, H. Martens, K. Rudi, T. Næs, C. Kirschner, A. Kohler // J. Microbiol. Methods. – 2006. – Vol. 65. – No. 3. – P. 573–584.

108. dos Santos Ferreira, N. Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Sp245 as the type strain of *Azospirillum baldaniorum* sp. nov / N. dos Santos Ferreira, F. Hayashi Sant'Anna, V. Massena Reis, A. Ambrosini, C. Gazolla Volpiano, M. Rothballer, S. Schwab, V.A. Baura, E. Balsanelli, F. de Oliveira Pedrosa, L.M. Pereira Passaglia, E.M. de Souza, A. Hartmann, F. Cassán, J.E. Zilli // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2020. – A. ijsem004517.

109. Ferone, M. Microbial detection and identification methods: Bench top assays to omics approaches / M. Ferone, A. Gowen, S. Fanning, A.G. Scannell // *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* – 2020. – Vol. 19. – No. 6. – P. 3106–3129.

110. Wenning, M. Infrared spectroscopy in the identification of microorganisms / M. Wenning, S. Scherer, D. Naumann // *Handbook of Vibrational Spectroscopy.* – John Wiley & Sons, 2006. – P. 1–26.

111. Bresan, S. Polyhydroxyalkanoate (PHA) granules have no phospholipids / S. Bresan, A. Sznajder, W. Hauf, K. Forchhammer, D. Pfeiffer, D. Jendrosseck // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol. 6. – No. 1. – P. 1–13.

112. Rothermich, M.M. Characterization, seasonal occurrence, and diel fluctuation of poly (hydroxyalkanoate) in photosynthetic microbial mats / M.M. Rothermich, R. Guerrero, R.W. Lenz, S. Goodwin // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2000. – Vol. 66. – No. 10. – P. 4279–4291.

113. Urmeneta, J. Biodegradation of poly-(beta)-hydroxyalkanoates in a lake sediment sample increases bacterial sulfate reduction / J. Urmeneta, J. Mas-Castella, R. Guerrero // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1995. – Vol. 61. – No. 5. – P. 2046–2048.

114. Bergersen, F.J. A role for poly- β -hydroxybutyrate in bacteroids of soybean root nodules / F.J. Bergersen, M.B. Peoples, G.L. Turner // *Proc. Royal Soc. B.* – 1991. – Vol. 245. – No. 1312. – P. 59–64.

115. Tal, S. Production of the reserve material poly- β -hydroxybutyrate and its function in *Azospirillum brasilense* Cd / S. Tal, Y. Okon // *Can. J. Microbiol.* – 1985. – Vol. 31. – No. 7. – P. 608–613.

116. Ruiz, J.A. Polyhydroxyalkanoate degradation is associated with nucleotide accumulation and enhances stress resistance and survival of *Pseudomonas oleovorans* in natural water microcosms / J.A. Ruiz, N.I. López, R.O. Fernández, B.S. Méndez // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2001. – Vol. 67. – No. 1. – P. 225–230.

117. Kadouri, D. Identification and isolation of genes involved in poly (β -hydroxybutyrate) biosynthesis in *Azospirillum brasilense* and characterization of a

phbC mutant / D. Kadouri, S. Burdman, E. Jurkevitch, Y. Okon // Appl. Environ. Microbiol. – 2002. – Vol. 68. – No. 6. – P. 2943–2949.

118. Kadouri, D. Involvement of the reserve material poly- β -hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* stress endurance and root colonization / D. Kadouri, E. Jurkevitch, Y. Okon // Appl. Environ. Microbiol. – 2003a. – Vol. 69. – No. 6. – P. 3244–3250.

119. Kadouri, D. Poly β -hydroxybutyrate depolymerase (PhaZ) in *Azospirillum brasilense* and characterization of a *phaZ* mutant / D. Kadouri, E. Jurkevitch, Y. Okon // Arch. Microbiol. – 2003b. – Vol. 180. – No. 5. – P. 309–318.

120. Zhao, Y.H. Disruption of the polyhydroxyalkanoate synthase gene in *Aeromonas hydrophila* reduces its survival ability under stress conditions / Y.H. Zhao, H.M. Li, L.F. Qin, H.H. Wang, G.-Q. Chen // FEMS Microbiol. Lett. – 2007. – Vol. 276. – No. 1. – P. 34–41.

121. Wang, Q. Complete PHB mobilization in *Escherichia coli* enhances the stress tolerance: a potential biotechnological application / Q. Wang, H. Yu, Y. Xia, Z. Kang, Q. Qi // Microb. Cell Fact. – 2009. – Vol. 8. – No. 1. – P. 1–9.

122. Khosravi–Darani, K. Microbial production of poly(hydroxybutyrate) from C₁ carbon sources / K. Khosravi–Darani, Z.-B. Mokhtari, T. Amai, K. Tanaka // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2013. – Vol. 97. – No. 4. – P. 1407–1424.

123. Mokhtari–Hosseini, Z.B. Statistical media optimization for growth and PHB production from methanol by a methylotrophic bacterium / Z.B. Mokhtari–Hosseini, E. Vasheghani–Farahani, A. Heidarzadeh–Vazifekhoran, S.A. Shojaosadati, R. Karimzadeh, K.K. Darani // Bioresour. Technol. – 2009. – Vol. 100. – No. 8. – P. 2436–2443.

124. Goff, M. Improvement of the conversion of polystyrene to polyhydroxyalkanoate through the manipulation of the microbial aspect of the process: a nitrogen feeding strategy for bacterial cells in a stirred tank reactor / M. Goff, P.G. Ward, K.E. O'connor // J. Biotechnol. – 2007. – Vol. 132. – No. 3. – P. 283–286.

125. Chanprateep, S. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates / S. Chanprateep // J. Biosci. Bioeng. – 2010. – Vol. 110. – No. 6. – P. 621–632.

126. Johnson, K. Enrichment of a mixed bacterial culture with a high polyhydroxyalkanoate storage capacity / K. Johnson, Y. Jiang, R. Kleerebezem, G. Muyzer, M.C. Van Loosdrecht // Biomacromolecules. – 2009. – Vol. 10. – No. 4. – P. 670–676.

127. Lee, S.Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates / S.Y. Lee // *Biotechnol. Bioeng.* – 1996. – Vol. 49. – No. 1. – P. 1–14.

128. Kaur, G. Strategies for large-scale production of polyhydroxyalkanoates / G. Kaur, I. Roy // *Chem. Biochem. Eng. Q.* – 2015. – Vol. 29. – No. 2. – P. 157–172.

129. Kosseva, M.R. Trends in the biomanufacture of polyhydroxyalkanoates with focus on downstream processing / M.R. Kosseva, E. Rusbandi // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2018. – Vol. 107. – P. 762–778.

130. Yoshie, N. Complex composition distribution of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) / N. Yoshie, H. Menju, H. Sato, Y. Inoue // *Macromolecules.* – 1995. – Vol. 28. – No. 19. – P. 6516–6521.

131. Yokouchi, M. Structural studies of polyesters: 5. Molecular and crystal structures of optically active and racemic poly(β -hydroxybutyrate) / M. Yokouchi, Y. Chatani, H. Tadokoro, K. Teranishi, H. Tani // *Polymer.* – 1973. – Vol. 14. – No. 6. – P. 267–272.

132. Wang, H. Reinvestigation of crystal structure and intermolecular interactions of biodegradable poly(3-hydroxybutyrate) α -form and the prediction of its mechanical property / H. Wang, K. Tashiro // *Macromolecules.* – 2016. – Vol. 49. – No. 2. – P. 581–594.

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

134. Orts, W.J. Poly(hydroxyalkanoates): biorefinery polymers with a whole range of applications. The work of Robert H. Marchessault / W.J. Orts, G.A. Nobes, J. Kawada, S. Nguyen, G.E. Yu, F. Ravenelle // *Can. J. Chem.* – 2008. – Vol. 86. – No. 6. – P. 628–640.

135. Chen, G.Q. Microbial production and applications of chiral hydroxyalkanoates / G.Q. Chen, Q. Wu // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2005. – Vol. 67. – No. 5. – P. 592–599.

136. Zhang, X. Application of (R)-3-hydroxyalkanoate methyl esters derived from microbial polyhydroxyalkanoates as novel biofuels / X. Zhang, R. Luo, Z. Wang, Y. Deng, G.Q. Chen // *Biomacromolecules.* – 2009. – Vol. 10. – No. 4. – P. 707–711.

137. Zhang, J. Effect of expressing polyhydroxybutyrate synthesis genes (*phbCAB*) in *Streptococcus zooepidemicus* on production of lactic acid and hyaluronic

acid / J. Zhang, N. Hao, G.Q. Chen // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2006. – Vol. 71. – No. 2. – P. 222–227.

138. Lu, J. Mini-review: biosynthesis of poly(hydroxyalkanoates) / J. Lu, R.C. Tappel, C.T. Nomura // *J. Macromol. Sci. Polymer. Re.* – 2009. – Vol. 49. – No. 3. – P. 226–248.

139. Li, Z.J. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) from unrelated carbon sources by metabolically engineered *Escherichia coli* / Z.J. Li, Z.Y. Shi, J. Jian, Y.Y. Guo, Q. Wu, G.Q. Chen // *Metabolic engineering.* – 2010. – Vol. 12. – No. 4. – P. 352–359.

140. Chen, Y.J. Critical residues of class II PHA synthase for expanding the substrate specificity and enhancing the biosynthesis of polyhydroxyalkanoate / Y.J. Chen, P.C. Tsai, C.H. Hsu, C.Y. Lee // *Enzyme Microb. Technol.* – 2014. – Vol. 56. – P. 60–66.

141. Wang, Y. Synthesis of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate homopolymers, random copolymers, and block copolymers by an engineered strain of *Pseudomonas entomophila* / Y. Wang, A. Chung, G.Q. Chen // *Adv. Healthc. Mater.* – 2017. – Vol. 6. – No. 7. – A. 1601017.

142. Steinbüchel, A. Perspectives for biotechnological production and utilization of biopolymers: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoate biosynthesis pathways as a successful example / A. Steinbüchel // *Macromol. Biosci.* – 2001. – Vol. 1. – No. 1. – P. 1–24.

143. Rehm, B.H.A. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications / B.H.A. Rehm // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2010. – Vol. 8. – No. 8. – P. 578–592.

144. Chen, G.Q. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry / G.Q. Chen // *Chem. Soc. Rev.* – 2009. – Vol. 38. – No. 8. – P. 2434–2446.

145. Gahlawat, G. Production strategies for commercialization of PHA / G. Gahlawat // *Polyhydroxyalkanoates Biopolymers.* – Springer, Cham, 2019. – P. 31–67.

146. Kim, J. Crystal structure of *Ralstonia eutropha* polyhydroxyalkanoate synthase C-terminal domain and reaction mechanisms / J. Kim, Y.J. Kim, S.Y. Choi, S.Y. Lee, K.J. Kim // *Biotechnol. J.* – 2017. – Vol. 12. – No. 1. – A. 1600648.

147. Wittenborn, E.C. Structure of the catalytic domain of the class I polyhydroxybutyrate synthase from *Cupriavidus necator* / E.C. Wittenborn, M. Jost,

Y. Wei, J. Stubbe, C.L. Drennan // *J. Biol. Chem.* – 2016. – Vol. 291. – No. 48. – P. 25264–25277.

148. Sagong, H.Y. Structural insights into polyhydroxyalkanoates biosynthesis / H.Y. Sagong, H.F. Son, S.Y. Choi, S.Y. Lee, K.J. Kim // *Trends Biochem. Sci.* – 2018. – Vol. 43. – No. 10. – P. 790–805.

149. Kim, J. Crystal structure of (R)-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase PhaB from *Ralstonia eutropha* / J. Kim, J.H. Chang, E.J. Kim, K.J. Kim // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2014. – Vol. 443. – No. 3. – P. 783–788.

150. Sznajder, A. Comparative proteome analysis reveals four novel polyhydroxybutyrate (PHB) granule-associated proteins in *Ralstonia eutropha* H16 / A. Sznajder, D. Pfeiffer, D. Jendrossek // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2015. – Vol. 81. – No. 5. – P. 1847–1858.

151. Kobayashi, T. Purification and properties of an intracellular 3-hydroxybutyrate-oligomer hydrolase (PhaZ2) in *Ralstonia eutropha* H16 and its identification as a novel intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase / T. Kobayashi, M. Shiraki, T. Abe, A. Sugiyama, T. Saito // *J. Bacteriol.* – 2003. – Vol. 185. – No. 12. – P. 3485–3490.

152. Dinjaski, N. Swapping of phasin modules to optimize the in vivo immobilization of proteins to medium-chain-length polyhydroxyalkanoate granules in *Pseudomonas putida* / N. Dinjaski, M.A. Prieto // *Biomacromolecules.* – 2013. – Vol. 14. – No. 9. – P. 3285–3293.

153. Galán, B. Nucleoid-associated PhaF phasin drives intracellular location and segregation of polyhydroxyalkanoate granules in *Pseudomonas putida* KT2442 / B. Galán, N. Dinjaski, B. Maestro, L.I. De Eugenio, I.F. Escapa, J.M. Sanz, J.L. García, M.A. Prieto // *Mol. Microbiol.* – 2011. – Vol. 79. – No. 2. – P. 402–418.

154. Prieto, M.A. PhaF, a polyhydroxyalkanoate-granule-associated protein of *Pseudomonas oleovorans* GPo1 involved in the regulatory expression system for *pha* genes / M.A. Prieto, B. Bühler, K. Jung, B. Witholt, B. Kessler // *J. Bacteriol.* – 1999. – Vol. 181. – No. 3. – P. 858–868.

155. Handrick, R. Unraveling the function of the *Rhodospirillum rubrum* activator of polyhydroxybutyrate (PHB) degradation: the activator is a PHB-granule-bound protein (phasin) / R. Handrick, S. Reinhardt, D. Schultheiss, T. Reichart, D. Schüler, V. Jendrossek, D. Jendrossek // *J. Bacteriol.* – 2004. – Vol. 186. – No. 8. – P. 2466–2475.

156. Pieper-Fürst, U. Identification of the region of a 14-kilodalton protein of *Rhodococcus ruber* that is responsible for the binding of this phasin to polyhydroxyalkanoic acid granules / U. Pieper-Fürst, M.H. Madkour, F. Mayer, A. Steinbüchel // J. Bacteriol. – 1995. – Vol. 177. – No. 9. – P. 2513–2523.

157. Schultheiss, D. The presumptive magnetosome protein Mms16 is a poly(3-hydroxybutyrate) granule-bound protein (phasin) in *Magnetospirillum gryphiswaldense* / D. Schultheiss, R. Handrick, D. Jendrossek, M. Hanzlik, D. Schüler // J. Bacteriol. – 2005. – Vol. 187. – No. 7. – P. 2416–2425.

158. Lee, T.R. PhaQ, a new class of poly- β -hydroxybutyrate (PHB)-responsive repressor, regulates *phaQ* and *phaP* (phasin) expression in *Bacillus megaterium* through interaction with PHB / T.R. Lee, J.S. Lin, S.S. Wang, G.C. Shaw // J. Bacteriol. – 2004. – Vol. 186. – No. 10. – P. 3015–3021.

159. Pfeiffer, D. Identification of a multifunctional protein, PhaM, that determines number, surface to volume ratio, subcellular localization and distribution to daughter cells of poly(3-hydroxybutyrate), PHB, granules in *Ralstonia eutropha* H16 / D. Pfeiffer, A. Wahl, D. Jendrossek // Mol. Microbiol. – 2011. – Vol. 82. – No. 4. – P. 936–951.

160. Choi, S.Y. Microbial polyhydroxyalkanoates and nonnatural polyesters / S.Y. Choi, I.J. Cho, Y. Lee, Y.J. Kim, K.J. Kim, S.Y. Lee // Adv. Mater. – 2020. – Vol. 32. – No. 35. – A. 1907138.

161. Sim, S.J. PHA synthase activity controls the molecular weight and polydispersity of polyhydroxybutyrate *in vivo* / S.J. Sim, K.D. Snell, S.A. Hogan, J. Stubbe, C. Rha, A.J. Sinskey // Nat. Biotechnol. – 1997. – Vol. 15. – No. 1. – P. 63–67.

162. Rehm, B.H.A. Polyester synthases: natural catalysts for plastics / B.H.A. Rehm // Biochem. J. – 2003. – Vol. 376. – No. 1. – P. 15–33.

163. Yuan, W. Class I and III polyhydroxyalkanoate synthases from *Ralstonia eutropha* and *Allochromatium vinosum*: characterization and substrate specificity studies / W. Yuan, Y. Jia, J. Tian, K.D. Snell, U. Müh, A.J. Sinskey, R.H. Lambalot, C.T. Walsh, J. Stubbe // Arch. Biochem. Biophys. – 2001. – Vol. 394. – No. 1. – P. 87–98.

164. Stubbe, J.A. Polyhydroxyalkanoate (PHA) homeostasis: the role of the PHA synthase / J.A. Stubbe, J. Tian // Nat. Prod. Rep. – 2003. – Vol. 20. – No. 5. – P. 445–457.

165. Mezzolla, V. Role of PhaC type I and type II enzymes during PHA biosynthesis / V. Mezzolla, O.F. D'Urso, P. Poltronieri // *Polymers*. – 2018. – Vol. 10. – No. 8. – A. 910.

166. Yang, T.H. Tailor-made type II *Pseudomonas* PHA synthases and their use for the biosynthesis of polylactic acid and its copolymer in recombinant *Escherichia coli* / T.H. Yang, Y.K. Jung, H.O. Kang, T.W. Kim, S.J. Park, S.Y. Lee // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2011. – Vol. 90. – No. 2. – P. 603–614.

167. Fukui, T. Cloning and analysis of the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) biosynthesis genes of *Aeromonas caviae* / T. Fukui, Y. Doi // *J. Bacteriol.* – 1997. – Vol. 179. – No. 15. – P. 4821–4830.

168. Matsusaki, H. Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoate) biosynthesis genes in *Pseudomonas* sp. strain 61-3 / H. Matsusaki, S. Manji, K. Taguchi, M. Kato, T. Fukui, Y. Doi // *J. Bacteriol.* – 1998. – Vol. 180. – No. 24. – P. 6459–6467.

169. Ray, S. Microbial cometabolism and polyhydroxyalkanoate co-polymers / S. Ray, V.C. Kalia // *Indian J. Microbiol.* – 2017. – Vol. 57. – No. 1. – P. 39–47.

170. Reddy, C.S.K. Polyhydroxyalkanoates: an overview / C.S.K. Reddy, R. Ghai, V. Kalia // *Bioresour. Technol.* – 2003. – Vol. 87. – No. 2. – P. 137–146.

171. Kalia, V.C. Insight in to the phylogeny of polyhydroxyalkanoate biosynthesis: horizontal gene transfer / V.C. Kalia, S. Lal, S. Cheema // *Gene*. – 2007. – Vol. 389. – No. 1. – P. 19–26.

172. Slater, S.C. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 poly-beta-hydroxybutyrate biosynthetic pathway / S.C. Slater, W.H. Voige, D.E. Dennis // *J. Bacteriol.* – 1988. – Vol. 170. – No. 10. – P. 4431–4436.

173. Schubert, P. Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* genes for synthesis of poly-beta-hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in *Escherichia coli* / P. Schubert, A. Steinbüchel, H.G. Schlegel // *J. Bacteriol.* – 1988. – Vol. 170. – No. 12. – P. 5837–5847.

174. Huisman, G.W. Synthesis of poly-3-hydroxyalkanoates is a common feature of fluorescent pseudomonads / G.W. Huisman, O.L.A.V. de Leeuw, G. Eggink, B. Witholt // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1989. – Vol. 55. – No. 8. – P. 1949–1954.

175. Kourmentza, C. Recent advances and challenges towards sustainable polyhydroxyalkanoate (PHA) production / C. Kourmentza, J. Plácido, N. Venetsaneas, A. Burniol-Figols, C. Varrone, H.N. Gavala, M.A. Reis // *Bioengineering*. – 2017. – Vol. 4. – No. 2. – P. 55.

176. Reinecke, F. *Ralstonia eutropha* strain H16 as model organism for PHA metabolism and for biotechnological production of technically interesting biopolymers / F. Reinecke, A. Steinbuechel // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* – 2009. – Vol. 16. – No. 1–2. – P. 91–108.

177. Yu, J. Fixation of carbon dioxide by a hydrogen-oxidizing bacterium for value-added products / J. Yu // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 2018. – Vol. 34. – No. 7. – P. 1–7.

178. Vandamme, P. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found / P. Vandamme, T. Coenye // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2004. – Vol. 54. – No. 6. – P. 2285–2289.

179. Sudesh, K. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters / K. Sudesh, H. Abe, Y. Doi // *Prog. Polym. Sci.* – 2000. – Vol. 25. – No. 10. – P. 1503–1555.

180. Serafim, L.S. The influence of process parameters on the characteristics of polyhydroxyalkanoates produced by mixed cultures / L.S. Serafim, P.C. Lemos, C. Torres, M.A. Reis, A.M. Ramos // *Macromol. Biosci.* – 2008. – Vol. 8. – No. 4. – P. 355–366.

181. Amos, D.A. Composition of poly- β -hydroxyalkanoate from *Syntrophomonas wolfei* grown on unsaturated fatty acid substrates / D.A. Amos, M.J. McInerney // *Arch. Microbiol.* – 1991. – Vol. 155. – No. 2. – P. 103–106.

182. Anjum, A. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: a review of recent advancements / A. Anjum, M. Zuber, K.M. Zia, A. Noreen, M.N. Anjum, S. Tabasum // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2016. – Vol. 89. – P. 161–174.

183. Sodian, R. Tissue engineering of heart valves: in vitro experiences / R. Sodian, S.P. Hoerstrup, J.S. Sperling, S.H. Daebritz, D.P. Martin, F.J. Schoen, J.P. Vacanti, J.E. Mayer Jr // *Ann. Thorac. Surg.* – 2000. – Vol. 70. – No. 1. – P. 140–144.

184. Li, C. Poly(l-lactide-co-caprolactone) scaffolds enhanced with poly(β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate) microspheres for cartilage regeneration / C. Li, J. Zhang, Y. Li, S. Moran, G. Khang, Z. Ge, // *Biomed. Mater.* – 2013. – Vol. 8. – No. 2. – A. 025005.

185. Zonari, A. Endothelial differentiation of human stem cells seeded onto electrospun polyhydroxybutyrate/polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate fiber mesh / A. Zonari, S. Novikoff, N.R. Electo, N.M. Breyner, D.A. Gomes, A. Martins, N.M. Neves, R.L. Reis, A.M. Goes // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7. – No. 4. – A. e35422.

186. Gredes, T. Histological and molecular-biological analyses of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) patches for enhancement of bone regeneration / T. Gredes, T. Gedrange, C. Hinüber, M. Gelinsky, C. Kunert-Keil // *Ann. Anat. – Anatomischer Anzeiger.* – 2015. – Vol. 199. – P. 36–42.

187. Karahaliloglu, Z. Antibacterial nanostructured polyhydroxybutyrate membranes for guided bone regeneration / Z. Karahaliloglu, B. Ercan, E.N. Taylor, S. Chung, E.B. Denkbaş, T.J. Webster // *J. Biomed. Nanotechnol.* – 2015. – Vol. 11. – No. 12. – P. 2253–2263.

188. Ching, K.Y. Nanofibrous poly(3-hydroxybutyrate)/poly(3-hydroxyoctanoate) scaffolds provide a functional microenvironment for cartilage repair / K.Y. Ching, O.G. Andriotis, S. Li, P. Basnett, B. Su, I. Roy, R.S. Tare, B.G. Sengers, M. Stolz // *J. Biomater. Appl.* – 2016. – Vol. 31. – No. 1. – P. 77–91.

189. Levine, A.C. Influence of cross-linking on the physical properties and cytotoxicity of polyhydroxyalkanoate (PHA) scaffolds for tissue engineering / A.C. Levine, A. Sparano, F.F. Twigg, K. Numata, C.T. Nomura // *ACS Biomater. Sci. Eng.* – 2015. – Vol. 1. – No. 7. – P. 567–576.

190. Wu, Q. Medical application of microbial biopolyesters polyhydroxyalkanoates / Q. Wu, Y. Wang, G.Q. Chen // *Artif. Cells Blood Substit. Biotechnol.* – 2009. – Vol. 37. – No. 1. – P. 1–12.

191. Panith, N. Development of tunable biodegradable polyhydroxyalkanoates microspheres for controlled delivery of tetracycline for treating periodontal disease / N. Panith, A. Assavanig, S. Lertsiri, M. Bergkvist, R. Surarit, N. Niamsiri // *J. Appl. Polym. Sci.* – 2016. – Vol. 133. – No. 42. – A. 44128.

192. Peng, S.-W. An assessment of the risks of carcinogenicity associated with polyhydroxyalkanoates through an analysis of DNA aneuploid and telomerase activity / S.-W. Peng, X.-Y. Guo, G.-G. Shang, J. Li, X.-Y. Xu, M.-L. You, P. Li, G.-Q. Chen // *Biomaterials.* – 2011. – Vol. 32. – No. 10. – P. 2546–2555.

193. Goonoo, N. Third generation poly(hydroxyacid) composite scaffolds for tissue engineering / N. Goonoo, A. Bhaw-Luximon, P. Passanha, S.R. Esteves, D. Jhurry // *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* – 2017. – Vol. 105. – No. 6. – P. 1667–1684.

194. Ruth, K. Efficient production of (R)-3-hydroxycarboxylic acids by biotechnological conversion of polyhydroxyalkanoates and their purification / K. Ruth, A. Grubelnik, R. Hartmann, T. Egli, M. Zinn, Q. Ren // *Biomacromolecules.* – 2007. – Vol. 8. – No. 1. – P. 279–286.

195. Faveau, C. Synthetic studies on a phenyl-laulimalide analogue / C. Faveau, M. Mondon, J.P. Gesson, T. Mahnke, S. Gebhardt, U. Koert // *Tetrahedron Lett.* – 2006. – Vol. 47. – No. 47. – P. 8305–8308

196. Chung, A.-L. Production of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids by β -oxidation and *phaC* operon deleted *Pseudomonas entomophila* harboring thioesterase gene / A.-L. Chung, G.-D. Zeng, H.-L. Jin, Q. Wu, J.-C. Chen, G.-Q. Chen // *Metab. Eng.* – 2013. – Vol. 17. – P. 23–29.

197. Tarrand, J.J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. / J.J. Tarrand, N.R. Krieg, J. Döbereiner // *Can. J. Microbiol.* – 1978. – Vol. 24. – No. 8. – P. 967–980.

198. Bashan, Y. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture / Y. Bashan, H. Levanony // *Can. J. Microbiol.* – 1990. – Vol. 36. – No. 9. – P. 591–608.

199. Bashan, Y. *Azospirillum*–plant relationships: environmental and physiological advances (1990–1996) / Y. Bashan, G. Holguin // *Can. J. Microbiol.* – 1997. – Vol. 43. – No. 2. – P. 103–121.

200. Dekhil, S.B. Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. nov. / S.B. Dekhil, M. Cahill, L.I. Sly // *System. Appl. Microbiol.* – 1997. – Vol. 20. – No. 1. – P. 72–77.

201. Xie, C.-H. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa* / C.-H. Xie, A. Yokota // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2005. – Vol. 55. – No. 4. – P. 1435–1438.

202. Peng, G. *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass / G. Peng, H. Wang, G. Zhang, W. Hou, Y. Liu, E.T. Wang, Z. Tan // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2006. – Vol. 56. – No. 6. – P. 1263–1271.

203. Mehnaz, S. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere / S. Mehnaz, B. Weselowski, G. Lazarovits // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2007a. – Vol. 57. – No. 3. – P. 620–624.

204. Mehnaz, S. *Azospirillum zae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays* / S. Mehnaz, B. Weselowski, G. Lazarovits // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2007b. – Vol. 57. – No. 12. – P. 2805–2809.

205. Young, C.C. *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil / C.C. Young, H. Hupfer, C. Siering, M.-J. Ho, A.B. Arun, W.-A. Lai, P.D. Rekha, F.-T. Shen, M.-H. Hung, W.-M. Chen, A.F. Yassin // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2008. – Vol. 58. – No. 4. – P. 959–963.

206. Lin, S.-Y. *Azospirillum picis* sp. nov., isolated from discarded tar / S.-Y. Lin, C.C. Young, H. Hupfer, C. Siering, A.B. Arun, W.-M. Chen, W.-A. Lai, F.-T. Shen, P.D. Rekha, A.F. Yassin // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2009. – Vol. 59. – No. 4. – P. 761–765.

207. Lavrinenko, K. *Azospirillum thiophilum* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring / K. Lavrinenko, E. Chernousova, E. Gridneva, G. Dubinina, V. Akimov, J. Kuever, A. Lysenko, M. Grabovich // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2010. – Vol. 60. – No. 12. – P. 2832–2837.

208. Lin, S.-Y. *Azospirillum formosense* sp. nov., a diazotroph from agricultural soil / S.-Y. Lin, F.-T. Shen, L.-S. Young, Z.-L. Zhu, W.-M. Chen, C.-C. Young // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2012. – Vol. 62. – No. 5. – P. 1185–1190.

209. Zhou, S. *Azospirillum humicireducens* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from a microbial fuel cell / S. Zhou, L. Han, Y. Wang, G. Yang, L. Zhuang, P. Hu // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2013. – Vol. 63. – No. 7. – P. 2618–2624.

210. Lin, S.-Y. *Azospirillum fermentarium* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from a fermenter / S.-Y. Lin, Y.-C. Liu, A. Hameed, Y.-H. Hsu, W.-A. Lai, F.-T. Shen, C.-C. Young // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2013. – Vol. 63. – No. 10. – P. 3762–3768.

211. Lin, S.-Y. *Azospirillum soli* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from agricultural soil / S.-Y. Lin, A. Hameed, Y.-C. Liu, Y.-H. Hsu, W.-A. Lai, F.-T. Shen, C.-C. Young // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2015. – Vol. 65. – No. 12. – P. 4601–4607.

212. Lin, S.-Y. *Azospirillum agricola* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from cultivated soil / S.-Y. Lin, Y.-C. Liu, A. Hameed, Y.-H. Hsu, H.-I. Huang, W.-A. Lai, C.-C. Young // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2016. – Vol. 66. – No. 3. – P. 1453–1458.

213. Zhao, Z.-L. *Azospirillum thermophilum* sp. nov., isolated from a hot spring / Z.-L. Zhao, H. Ming, C.-L. Ding, W.-L. Ji, L.-J. Cheng, M.-M. Niu, Y.-M. Zhang, X.-L. Meng, G.-X. Nie // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2020. – Vol. 70. – No. 1. – P. 550–554.

214. Anandham, R. *Azospirillum ramasamyi* sp. nov., a novel diazotrophic bacterium isolated from fermented bovine products / R. Anandham, J. Heo, R. Krishnamoorthy, M. SenthilKumar, N.O. Gopal, S.-J. Kim, S.-W. Kwon // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2019. – Vol. 69. – No. 5. – P. 1369–1375.

215. Tikhonova, E.N. *Azospirillum palustre* sp. nov., a methylotrophic nitrogen-fixing species isolated from raised bog / E.N. Tikhonova, D.S. Grouzdev, I.K. Kravchenko // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2019. – Vol. 69. – No. 9. – P. 2787–2793.

216. Yang, Y. *Azospirillum griseum* sp. nov., isolated from lakewater / Y. Yang, R. Zhang, J. Feng, C. Wang, J. Chen // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2019. – Vol. 69. – No. 12. – P. 3676–3681.

217. Lin, S.-Y. Description of *Niveispirillum fermenti* gen. nov., sp. nov., isolated from a fermentor in Taiwan, transfer of *Azospirillum irakense* (1989) as *Niveispirillum irakense* comb. nov., and reclassification of *Azospirillum amazonense* (1983) as *Nitrospirillum amazonense* gen. nov. / S.-Y. Lin, A. Hameed, F.-T. Shen, Y.-C. Liu, Y.-H. Hsu, M. Shahina, W.-A. Lai, C. C. Young // *Antonie van Leeuwenhoek.* – 2014. – Vol. 105. – No. 6. – P. 1149–1162.

218. Okon, Y. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation / Y. Okon, C.A. Labandera-Gonzalez // *Soil Biol. Biochem.* – 1994. – Vol. 26. – No. 12. – P. 1591–1601.

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

220. Pereg, L. Assessment of affinity and specificity of *Azospirillum* for plants / L. Pereg, L.E. de-Bashan, Y. Bashan // *Plant Soil.* – 2016. – Vol. 399. – No. 2. – P. 389–414.

221. Okon, Y. Agronomic applications of *Azospirillum* and other PGPR / Y. Okon, C. Labandera-Gonzales, M. Lage, P. Lage // *Biological nitrogen fixation.* – John Wiley & Sons, 2015. – Vol. 2. – P. 921–933.

222. Hungria, M. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil / M. Hungria, R.J.

Campo, E.M. Souza, F.O. Pedrosa // *Plant Soil*. – 2010. – Vol. 331. – No. 1. – P. 413–425.

223. Spaepen, S. Auxin signaling in *Azospirillum brasilense*: a proteome analysis / S. Spaepen, J. Vanderleyden // *Biological nitrogen fixation*. – John Wiley & Sons, 2015. – Vol. 2. – P. 937-940.

224. Dobbelaere, S. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum* / S. Dobbelaere, A. Croonenborghs, A. Thys, D. Ptacek, J. Vanderleyden, P. Dutto, C. Labandera-Gonzalez, J. Caballero-Mellado, J.F. Aguirre, Y. Kapulnik, S. Brener, S. Burdman, D. Kadouri, S. Sarig, Ya. Okon // *Funct. Plant Biol.* – 2001. – Vol. 28. – No. 9. – P. 871–879.

225. Fukami, J. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation / J. Fukami, P. Cerezini, M. Hungria // *AMB Express*. – 2018. – Vol. 8. – No. 1. – P. 1–12.

226. Tien, T.M. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum L.*) / T.M. Tien, M.H. Gaskins, D.H. Hubbell // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1979. – Vol. 37. – No. 5. – P. 1016–1024.

227. Bottini, R. Identification of gibberellins A1, A3, and iso-A3 in cultures of *Azospirillum lipoferum* / R. Bottini, M. Fulchieri, D. Pearce, R.P. Pharis // *Plant Physiol.* – 1989. – Vol. 90. – No. 1. – P. 45–47.

228. Cohen, A.C. *Azospirillum brasilense* Sp245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in arabidopsis plants / A.C. Cohen, R. Bottini, P.N. Piccoli // *Plant Growth Regul.* – 2008. – Vol. 54. – No. 2. – P. 97–103.

229. Strzelczyk, E. Cytokinin-like substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources / E. Strzelczyk, M. Kampert, C.Y. Li // *Microbiol. Res.* – 1994. – Vol. 149. – No. 1. – P. 55–60.

230. Sahoo, R.K. Phenotypic and molecular characterization of native *Azospirillum* strains from rice fields to improve crop productivity / R.K. Sahoo, M.W. Ansari, M. Pradhan, T.K. Dangar, S. Mohanty, N. Tuteja // *Protoplasma*. – 2014. – Vol. 251. – No. 4. – P. 943–953.

231. Turan, M. Yield promotion and phosphorus solubilization by plant growth-promoting rhizobacteria in extensive wheat production in Turkey / M. Turan, M. Gulluce, N. von Wirén, F. Sahin, // *J. Soil Sci. Plant Nutr.* – 2012. – Vol. 175. – No. 6. – P. 818–826.

232. Creus, C.M. Water relations and yield in *Azospirillum*-inoculated wheat exposed to drought in the field / C.M. Creus, R.J. Sueldo, C.A. Barassi // *Can. J. Bot.* – 2004. – Vol. 82. – No. 2. – P. 273–281.

233. Rodríguez-Salazar, J. Trehalose accumulation in *Azospirillum brasilense* improves drought tolerance and biomass in maize plants / J. Rodríguez-Salazar, R. Suárez, J. Caballero-Mellado, G. Iturriaga // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2009. – Vol. 296. – No. 1. – P. 52–59.

234. Kim, Y.C. Enhancement of plant drought tolerance by microbes / Y.C. Kim, B.R. Glick, Y. Bashan, C.M. Ryu // *Plant responses to drought stress.* – Springer, Berlin, Heidelberg, 2012. – P. 383–413.

235. Yang, J. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress / J. Yang, J.W. Kloepper, C.M. Ryu // *Trends Plant Sci.* – 2009. – Vol. 14. – No. 1. – P. 1–4.

236. Bashan, Y. Protection of tomato seedlings against infection by *Pseudomonas syringae* pv. tomato by using the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* / Y. Bashan, L.E. De-Bashan // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2002. – Vol. 68. – No. 6. – P. 2637–2643.

237. Romero, A.M. Effect of *Azospirillum*-mediated plant growth promotion on the development of bacterial diseases on fresh-market and cherry tomato / A.M. Romero, O.S. Correa, S. Moccia, J.G. Rivas // *J. Appl. Microbiol.* – 2003. – Vol. 95. – No. 4. – P. 832–838.

238. Tortora, M.L. *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum* / M.L. Tortora, J.C. Díaz-Ricci, R.O. Pedraza // *Arch. Microbiol.* – 2011. – Vol. 193. – No. 4. – P. 275–286.

239. Van Loon, L.C. Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria / L.C. Van Loon, P. Bakker // *PGPR: Biocontrol and biofertilization.* – Springer, Dordrecht, 2005. – P. 39–66.

240. Николаев, Ю.А. Биопленка – “город микробов” или аналог многоклеточного организма? / Ю.А. Николаев, В.К. Плакунов // *Микробиология.* – 2007. – Т. 76. – №. 2. – С. 149–163.

241. Rickard, A.H. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms / A.H. Rickard, P. Gilbert, N.J. High, P.E. Kolenbrander, P.S. Handley // *Trends Microbiol.* – 2003. – Vol. 11. – No. 2. – P. 94–100.

242. Zhurina, M.V. Composition and functions of the extracellular polymer matrix of bacterial biofilms / M.V. Zhurina, A.V. Gannesen, E.L. Zdorovenko, V.K. Plakunov // *Microbiology*. – 2014. – Vol. 83. – No. 6. – P. 713–722.

243. Römling, U. C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system / U. Römling, M. Gomelsky, M.Y. Galperin // *Mol. Microbiol.* – 2005. – Vol. 57. – No. 3. – P. 629–639.

244. Ramírez-Mata, A. The cyclic-di-GMP diguanylate cyclase CdgA has a role in biofilm formation and exopolysaccharide production in *Azospirillum brasilense* / A. Ramírez-Mata, L.I. López-Lara, M.L. Xiqui-Vázquez, S. Jijón-Moreno, A. Romero-Osorio, B.E. Baca // *Res. Microbiol.* – 2016. – Vol. 167. – No. 3. – P. 190–201.

245. Karatan, E. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms / E. Karatan, P. Watnick // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2009. – Vol. 73. – No. 2. – P. 310–347.

246. Arruebarrena Di Palma, A. Denitrification-derived nitric oxide modulates biofilm formation in *Azospirillum brasilense* / A. Arruebarrena Di Palma, C.M. Pereyra, L. Moreno Ramirez, M.L. Xiqui Vázquez, B.E. Baca, M.A. Pereyra, L. Lamattina, C.M. Creus // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2013. – Vol. 338. – No. 1. – P. 77–85.

247. Alexandre, G. Energy taxis is the dominant behavior in *Azospirillum brasilense* / G. Alexandre, S.E. Greer, I.B. Zhulin // *J. Bacteriol.* – 2000. – Vol. 182. – N. 21. – P. 6042–6048.

248. Shelud'ko, A.V. Polar flagellum of the alphaproteobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 plays a role in biofilm biomass accumulation and in biofilm maintenance under stationary and dynamic conditions / A.V. Shelud'ko, Y.A. Filip'echeva, E.M. Telesheva, S.S. Yevstigneeva, L.P. Petrova, E.I. Katsy // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 2019. – Vol. 35. – No. 2. – P. 19.

249. Croes, C.L. The polar flagellum mediates *Azospirillum brasilense* adsorption to wheat roots / C.L. Croes, S. Moens, E. van Bastelaere, J. Vanderleyden, K.W. Michiels // *Microbiology*. – 1993. – Vol. 139. – No. 9. – P. 2261–2269.

250. Malinich, E.A. The plant growth promoting bacterium *Azospirillum brasilense* is vertically transmitted in *Phaseolus vulgaris* (common bean) / E.A. Malinich, C.E. Bauer // *Symbiosis*. – 2018. – Vol. 76. – No. 2. – P. 97–108.

251. Шелудько, А.В. Колонизация корней пшеницы бактериями *Azospirillum brasilense* с различной подвижностью / А.В. Шелудько, А.А.

Широков, М.К. Соколова, О.И. Соколов, Л.П. Петрова, Л.Ю. Матора, Е.И. Кацы // Микробиология. – 2010. – Т. 79. – №. 5. – С. 696–704.

252. Lerner, A. The *Azospirillum brasilense* Sp7 *noeJ* and *noeL* genes are involved in extracellular polysaccharide biosynthesis / A. Lerner, S. Castro-Sowinski, A. Valverde, H. Lerner, R. Dror, Y. Okon, S. Burdman // Microbiology. – 2009. – Vol. 155. – No. 12. – P. 4058–4068.

253. Burdman, S. Involvement of outer-membrane proteins in the aggregation of *Azospirillum brasilense* / S. Burdman, E. Jurkevitch, B. Schwartsburd, Y. Okon // Microbiology. – 1999. – Vol. 145. – No. 5. – P. 1145–1152.

254. Burdman, S. Extracellular polysaccharide composition of *Azospirillum brasilense* and its relation with cell aggregation / S. Burdman, E. Jurkevitch, M.E. Soria-Díaz, A.M.G. Serrano, Y. Okon // FEMS Microbiol. Lett. – 2000. – Vol. 189. – No. 2. – P. 259–264.

255. Castellanos, T. Cell-surface lectins of *Azospirillum spp* / T. Castellanos, F. Ascencio, Y. Bashan // Curr. Microbiol. – 1998. – Vol. 36. – No. 4. – P. 241–244.

256. Skvortsov, I.M. Extracellular polysaccharides and polysaccharide-containing biopolymers from *Azospirillum* species: properties and the possible role in interaction with plant roots / I.M. Skvortsov, V.V. Ignatov // FEMS Microbiol. Lett. – 1998. – Vol. 165. – No. 2. – P. 223–229.

257. Шелудько, А.В. Влияние мутаций в синтезе липополисахаридов и полисахаридов, связывающих калькофлуор, на формирование биопленок *Azospirillum brasilense* / А.В. Шелудько, О.В. Кулибякина, А.А. Широков, Л.П. Петрова, Л.Ю. Матора, Е.И. Кацы // Микробиология. – 2008. – Т. 77. – №. 3. – С. 358–363.

258. Шелудько, А.В. Характеристика углеводсодержащих компонентов биопленок *Azospirillum brasilense* Sp245 / А.В. Шелудько, Ю.А. Филипьева, Е.М. Телешева, А.М. Буров, С.С. Евстигнеева, Г.Л. Бурыгин, Л.П. Петрова // Микробиология. – 2018. – Т. 87. – №. 5. – С. 483–494.

259. Шумилова, Е.М. Изменение свойств клеточной поверхности и эффективности формирования биопленок у мутантов бактерии *Azospirillum brasilense* Sp245 по предполагаемым генам липидного метаболизма *mmsB1* и *fabG1* / Е.М. Шумилова, А.В. Шелудько, Ю.А. Филипьева, С.С. Евстигнеева, Е.Г. Пономарева, Л.П. Петрова, Е.И. Кацы // Микробиология. – 2016. – Т. 85. – №. 2. – С. 162–170.

260. Шелудько, А.В. Анализ ультраструктуры клеток в составе биопленок бактерий *Azospirillum brasilense* / А.В. Шелудько, Д.И. Мокеев, С.С. Евстигнеева, Ю.А. Филипьевичева, А.М. Буров, Л.П. Петрова, Е.Г. Пономарева, Е.И. Кацы // Микробиология. – 2020. – Т. 89. – №. 1. – С. 59–73.

261. Itzigsohn, R. Polyhydroxyalkanoate analysis in *Azospirillum brasilense* / R. Itzigsohn, O. Yarden, Y. Okon // Can. J. Microbiol. – 1995. – Vol. 41. – No. 13. – P. 73–76.

262. Мулюкин, А.Л. Разнообразие морфотипов покоящихся клеток и условия их образования у *Azospirillum brasilense* / А.Л. Мулюкин, Н.Е. Сузина, А.Ю. Погорелова, Л.П. Антонюк, В.И. Дуда, Г.И. Эль-Регистан // Микробиология. – 2009. – Т. 78. – №. 1. – С. 42–51.

263. Okon, Y. Poly- β -hydroxybutyrate metabolism in *Azospirillum brasilense* and the ecological role of PHB in the rhizosphere / Y. Okon, R. Itzigsohn // FEMS Microbiol. Rev. – 1992. – Vol. 9. – No. 2–4. – P. 131–139.

264. Baldani, V.L.D. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat / V.L.D. Baldani, J.I. Baldani, J. Döbereiner // Can. J. Microbiol. – 1983. – Vol. 29. – No. 8. – P. 924–929.

265. Filip'echeva, Y.A. Plasmid AZOBR_p1-borne *fabG* gene for putative 3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase is essential for proper assembly and work of the dual flagellar system in the alphaproteobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 / Y.A. Filip'echeva, A.V. Shelud'ko, A.G. Prilipov, G.L. Burygin, E.M. Telesheva, S.S. Yevstigneyeva, M.P. Chernyshova, L.P. Petrova, E.I. Katsy // Can. J. Microbiol. – 2018. – Vol. 64. – No. 2. – P. 107–118.

266. Döbereiner, J. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. Symposium on Nitrogen Fixation / J. Döbereiner, J.M. Day // Washington State University Press, Pullman, 1976. – P. 518–538.

267. Fuller, M.P. Infrared microsampling by diffuse reflectance Fourier transform spectrometry / M.P. Fuller, P.R. Griffiths // Appl. Spectrosc. – 1980. – Vol. 34. – No. 5. – P. 533–539.

268. TeVrucht, M.L. E. Quantitative investigation of matrices for diffuse reflectance infrared Fourier transform spectrometry / M.L. E. TeVrucht, P.R. Griffiths // Talanta. – 1991. – Vol. 38. – No. 8. – P. 839–849.

269. Mattia, J. Effect of hydration on band intensities in diffuse infrared spectra of samples in alkali halide matrices / J. Mattia, P.C. Painter, D.A. Heaps, P.R. Griffiths // *Appl. Spectrosc.* – 2005. – Vol. 59. – No. 1. – P. 140–143.

270. Iwaoka, T. Diffuse reflectance infrared spectrometry of inorganic materials / T. Iwaoka, S.H. Wang, P.R. Griffiths // *Spectrochim. Acta A Mol. Spectrosc.* – 1985. – Vol. 41. – No. 1–2. – P. 37–41.

271. Olinger, J.M. Effects of sample dilution and particle size/morphology on diffuse reflection spectra of carbohydrate systems in the near-and mid-infrared. Part I: single analytes / J.M. Olinger, P.R. Griffiths // *Appl. Spectrosc.* – 1993. – Vol. 47. – No. 6. – P. 687–694.

272. Kamnev, A.A. Comparative spectroscopic characterization of different pectins and their sources / A.A. Kamnev, M. Colina, J. Rodriguez, N.M. Ptitchkina, V.V. Ignatov // *Food Hydrocoll.* – 1998. – Vol. 12. – No. 3. – P. 263–271.

273. Castro-Sowinski, S. Natural functions of bacterial polyhydroxyalkanoates / S. Castro-Sowinski, S. Burdman, O. Matan, Y. Okon // *Plastics From Bacteria.* – Springer, Berlin, Heidelberg, 2010. – P. 39–61.

274. Kansiz, M. Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy for monitoring and determining the degree of crystallisation of polyhydroxyalkanoates (PHAs) / M. Kansiz, A. Domínguez-Vidal, D. McNaughton, B. Lendl // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2007. – Vol. 388. – No. 5. – P. 1207–1213.

275. Volova, T.G. The physicochemical properties of polyhydroxyalkanoates with different chemical structures / T.G. Volova, N.O. Zhila, E.I. Shishatskaya, P.V. Mironov, A.D. Vasil'ev, A.G. Sukovaty, A.J. Sinskey // *Polym. Sci. Ser. A.* – 2013. – Vol. 55. – No. 7. – P. 427–437.

276. Volova, T.G. Synthesis of poly(3HB-co-3HHx) copolymers containing high molar fraction of 3-hydroxyhexanoate monomer by *Cupriavidus eutrophus* B10646 / T.G. Volova, D.A. Syrvacheva, N.O. Zhila, A.G. Sukovaty // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* – 2016. – Vol. 91. – No. 2. – P. 416–425.

277. Hong, K. A rapid method for detecting bacterial polyhydroxyalkanoates in intact cells by Fourier transform infrared spectroscopy / K. Hong, S. Sun, W. Tian, G.Q. Chen, W. Huang // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1999. – Vol. 51. – No. 4. – P. 523–526.

278. Porter, M. Crystallization kinetics of poly(3-hydroxybutyrate) granules in different environmental conditions / M. Porter, J. Yu // *J. Biomater. Nanobiotechnol.* – 2011. – Vol. 2. – No. 03. – P. 301.

279. Bloembergen, S. Studies of composition and crystallinity of bacterial poly(β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate) / S. Bloembergen, D.A. Holden, G.K. Hamer, T.L. Bluhm, R.H. Marchessault // *Macromolecules*. – 1986. – Vol. 19. – No. 11. – P. 2865–2871.

280. Lauzier, C. Structural study of isolated poly(β -hydroxybutyrate) granules / C. Lauzier, R.H. Marchessault, P. Smith, H. Chanzy // *Polymer*. – 1992. – Vol. 33. – No. 4. – P. 823–827.

281. Padermshoke, A. Melting behavior of poly(3-hydroxybutyrate) investigated by two-dimensional infrared correlation spectroscopy / A. Padermshoke, Y. Katsumoto, H. Sato, S. Ekgasit, I. Noda, Y. Ozaki // *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* – 2005. – Vol. 61. – No. 4. – P. 541–550.

282. Venyaminov, S.Y. Water (H_2O and D_2O) molar absorptivity in the 1000–4000 cm^{-1} range and quantitative infrared spectroscopy of aqueous solutions / S.Y. Venyaminov, F.G. Prendergast // *Anal. Biochem.* – 1997. – Vol. 248. – No. 2. – P. 234–245.

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

284. Kansiz, M. Quantitative determination of the biodegradable polymer poly(β -hydroxybutyrate) in a recombinant *Escherichia coli* strain by use of mid-infrared spectroscopy and multivariate statistics / M. Kansiz, H. Billman-Jacobe, D. McNaughton // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2000. – Vol. 66. – No. 8. – P. 3415–3420.

285. Madison, L.L. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic / L.L. Madison, G.W. Huisman // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 1999. – Vol. 63. – No. 1. – P. 21–53.

286. Садовникова, Ю.Н. Особенности клеточных ответов *Azospirillum brasilense* на воздействие стрессовых факторов и лектина пшеницы: дис. канд. биол. наук: 03.00.04, 03.00.07 / Садовникова Юлия Нкиолаевна. – ИБФРМ РАН, 2008. – 162 с.

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

288. Schlöter, M. Endophytic and surface colonization of wheat roots (*Triticum aestivum*) by different *Azospirillum brasilense* strains studied with strain-specific

monoclonal antibodies / M. Schloter, A. Hartmann // *Symbiosis*. – 1998. – Vol. 25. – P. 159–179.

289. Levanony, H. Ultrastructural localization and identification of *Azospirillum brasilense* Cd on and within wheat root by immuno-gold labeling / H. Levanony, Y. Bashan, B. Romano, E. Klein // *Plant Soil*. – 1989. – Vol. 117. – No. 2. – P. 207–218.

290. Sedlacek, P. What keeps polyhydroxyalkanoates in bacterial cells amorphous? A derivation from stress exposure experiments / P. Sedlacek, E. Slaninova, V. Enev, M. Koller, J. Nebesarova, I. Marova, K. Hrubanova, V. Krzyzanek, O. Samek, S. Obruca // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2019. – Vol. 103. – No. 4. – P. 1905–1917.

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

292. Możejko-Ciesielska, J. Bacterial polyhydroxyalkanoates: still fabulous? / J. Możejko-Ciesielska, R. Kiewisz // *Microbiol. Res.* – 2016. – Vol. 192. – P. 271–282.

293. Obruca, S. Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications / S. Obruca, P. Sedlacek, M. Koller, D. Kucera, I. Pernicova // *Biotechnol. Adv.* – 2018. – Vol. 36. – No. 3. – P. 856–870.

294. Slaninova, E. Light scattering on PHA granules protects bacterial cells against the harmful effects of UV radiation / E. Slaninova, P. Sedlacek, F. Mravec, L. Mullerova, O. Samek, M. Koller, O. Hesko, D. Kucera, I. Marova, S. Obruca // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2018. – Vol. 102. – No. 4. – P. 1923–1931.

295. Obruca, S. Novel unexpected functions of PHA granules / S. Obruca, P. Sedlacek, E. Slaninova, I. Fritz, C. Daffert, K. Meixner, Z. Sedrlova, M. Koller // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2020. – Vol. 104. – No. 11. – P. 4795–4810.

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

297. Alvarez-Ordóñez, A. Fourier transform infrared spectroscopy as a tool to characterize molecular composition and stress response in foodborne pathogenic bacteria / A. Alvarez-Ordóñez, D.J.M. Mouwen, M. Lopez, M. Prieto // *J. Microbiol. Meth.* – 2011. – Vol. 84. – No. 3. – P. 369–378.

298. Ojeda, J.J. Fourier transform infrared spectroscopy for molecular analysis of microbial cells / J.J. Ojeda, M. Dittrich // *Microbial Systems Biology*. – Humana Press, Totowa, NJ, 2012. – P. 187–211.

299. Movasaghi, Z. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues / Z. Movasaghi, S. Rehman, D.I. ur Rehman // *Appl. Spectrosc. Rev.* – 2008. – Vol. 43. – No. 2. – P. 134–179.

300. Kamnev, A.A. Spectroscopic characterization of cell membranes and their constituents of the plant-associated soil bacterium *Azospirillum brasilense* / A.A. Kamnev, L.P. Antonyuk, L.Y. Matora, O.B. Serebrennikova, M.V. Sumaroka, M. Colina, M.-F. Renou-Gonnord, V.V. Ignatov // *J. Mol. Struct.* – 1999. – Vol. 480. – P. 387–393.

301. Sato, H. Specific crystal structure of poly(3-hydroxybutyrate) thin films studied by infrared reflection–absorption spectroscopy / H. Sato, R. Murakami, K. Mori, Y. Ando, I. Takahashi, I. Noda, Y. Ozaki // *Vib. Spectrosc.* – 2009. – Vol. 51. – No. 1. – P. 132–135.

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