

ИЗМЕРЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА БАКТЕРИЙ МЕТОДОМ ГКР-СПЕКТРОСКОПИИ¹

© 2025 г. А. М. Буров¹, Е. В. Крючкова¹, Б. Н. Хлебцов^{1, *}, Е. Г. Завьялова²

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр «Саратовский научный центр РАН», просп. Энтузиастов, 13, Саратов, 410049 Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Ленинские Горы, 1, Москва, 119234 Россия

*e-mail: Khlebtsov-b@ibpm.ru

Аннотация. Традиционные методы количественной идентификации бактерий требуют значительных временных затрат, что существенно ограничивает их оперативность. В данной работе предложена быстрая и простая методика определения числа бактериальных клеток *S. aureus* 209р и *E. coli* K12, меченых наночастицами разной морфологии (наностержни и нанозвезды), модифицированных 4-нитротиофенолом на основе непрямой спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния. Показана зависимость увеличения сигнала гигантского комбинационного рассеяния от количества бактериальных клеток, меченых наночастицами. Разработанная методика демонстрировала хорошую работоспособность как для варианта прямого измерения сигнала от свежеприготовленного комплекса, так и для осадка клеток после центрифугирования. Наиболее статистически достоверные результаты получены при использовании золотых нанозвезд в условиях прямого безосадочного измерения сигнала гигантского комбинационного рассеяния от комплекса с бактериями.

Ключевые слова: ГКР-метки, бактерии, плазмонный резонанс

Финансирование работы. Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 24-65-00015).

Соблюдение этических стандартов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Поступила в редакцию 19.08.2025

После доработки 25.09.2025

Принята к публикации 26.09.2025

BACTERIA COUNTING BY SERS SPECTROSCOPY

A. M. Burov¹, E. V. Kryuchkova¹, B. N. Khlebtsov^{1, *}, E. S. Zavyalova²

¹*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences,
Separate Structural Subdivision of the Federal State Budgetary Scientific Institution, Federal Research Center*

“Saratov Scientific Center of Russian Academy of Sciences”, Saratov, 410049 Russia

²*Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia*

*e-mail: Khlebtsov-b@ibppm.ru

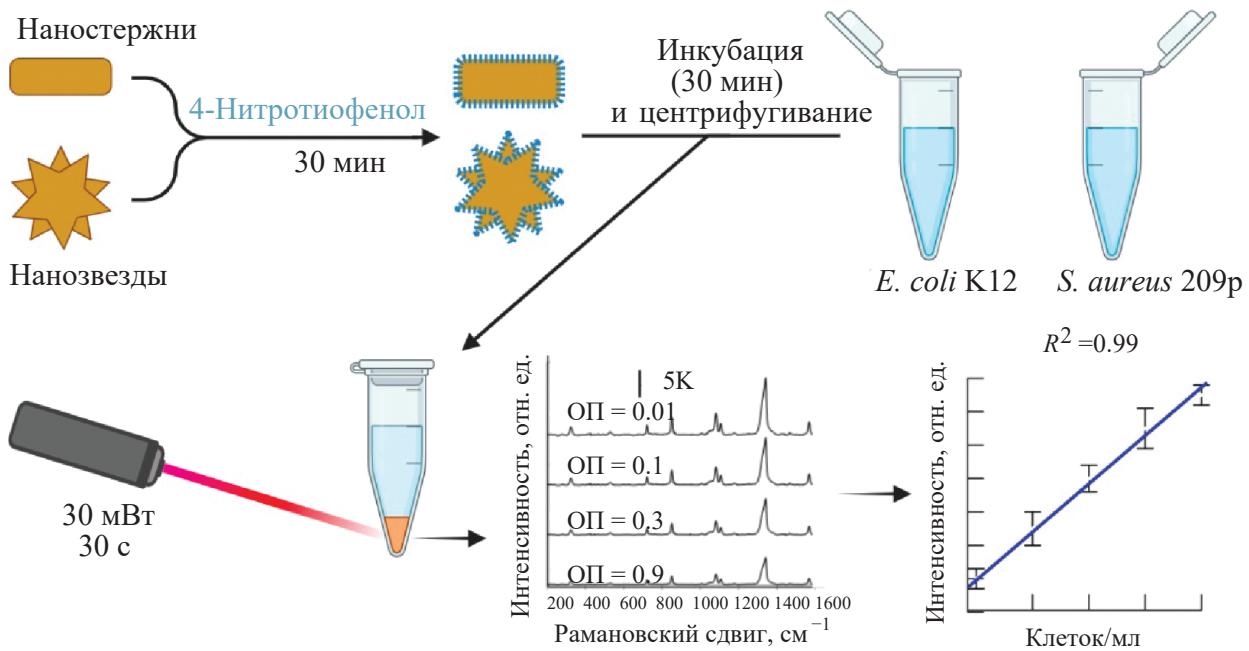
Abstract. Traditional bacterial identification methods based on cultivation require significant time, which substantially limits their operational efficiency. This paper proposes a rapid and simple method for the quantification of *S. aureus* 209p and *E. coli* K12 bacterial cells based on indirect SERS spectroscopy using gold nanostar and nanorod tags conjugated with the 4-nitrothiophenol reporter molecule. The dependence of the SERS signal on the number of nanoparticle-labeled bacterial cells was investigated. The developed method for estimating bacterial cell count demonstrated good performance both for the direct measurement of the signal from the freshly prepared complex and for measuring the signal from the pellet after centrifugation. The most statistically significant results were obtained using gold nanostars under direct, pellet-free measurement conditions of the SERS signal from the bacteria complex.

Keywords: SERS tags, bacteria, plasmon resonance

Funding. This work was supported by the Russian Science Foundation (project no. 24-65-00015).

Ethics declarations. The authors of this work declare that they have no conflict of interest.

Received August 19, 2025
Revised September 25, 2025
Accepted September 26, 2025



ВВЕДЕНИЕ

Бактериальные инфекции остаются одной из наиболее серьезных и постоянных угроз для глобального здравоохранения, приводя к значительной заболеваемости, смертности и экономическим потерям [1]. Ключевым фактором, затрудняющим эффективную борьбу с этими инфекциями, является отсутствие надежных, быстрых и доступных методов обнаружения и идентификации патогенных микроорганизмов на ранних стадиях заболевания. Задержки в диагностике напрямую влияют на своевременность и адекватность назначения терапии, способствуя развитию осложнений и неоправданному использованию антибиотиков, что усугубляет проблему антимикробной резистентности [2]. В настоящее время «золотым стандартом» для качественного определения бактерий, их идентификации и тестирования чувствительности к антибиотикам по-прежнему остается традиционный метод культивирования на селективных и дифференциальных средах с последующим морфологическим и биохимическим анализом выросших колоний [3]. Несмотря на свою фундаментальную надежность и информативность, этот подход обладает существенным недостатком — продолжительностью анализа, который может занимать от 24 до 48 ч, а в случае медленно растущих или требовательных микроорганизмов — и до нескольких суток.

Не менее критичной, чем качественная идентификация, является задача точной количественной оценки бактериальных клеток в образце. Количество жизнеспособных бактерий (биомасса) является ключевым параметром для оценки тяжести инфекции, эффективности

антимикробных агентов *in vitro* и *in vivo*, изучения кинетики роста, стандартизации экспериментов и контроля качества в биотехнологических процессах [4]. В настоящее время для оценки числа бактериальных клеток в суспензии используются ряд подходов. Во-первых, метод подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ), основанный на серийных разведениях образца и последующем посеве на плотные среды с подсчетом видимых колоний после инкубации [5, 6]. Хотя метод считается эталонным для оценки числа жизнеспособных клеток, он трудоемок и требует длительного времени. Во-вторых, спектрофотометрический метод измерения оптической плотности (ОП): быстрый и простой косвенный метод, оценивающий мутность суспензии бактерий, пропорциональную их концентрации [7, 8]. Однако он не различает живые и мертвые клетки, чувствителен к загрязнениям, размеру и форме клеток и требует построения калибровочных кривых для каждого конкретного штамма. Наконец, проточная цитометрия — высокопроизводительный метод, позволяющий анализировать отдельные клетки в потоке, оценивая их количество, размер, сложность и физиологическое состояние с помощью флуоресцентных красителей [9, 10]. Несмотря на высокую информативность, метод требует дорогостоящего оборудования, сложной пробоподготовки, а также может быть ограничен при работе с агрегированными клетками или сложными матрицами.

Перспективной альтернативой для одновременного качественного и количественного анализа бактериальных культур выступает метод спектроскопии комбинационного рассеяния (КР), который имеет высокую информативность и специфичность [11]. Дополнительным

преимуществом этой методики является минимальная пробоподготовка, а анализ часто может проводиться непосредственно на клетках в суспензии или на фильтрах, без сложных этапов фиксации, окрашивания или выделения ДНК/РНК [12, 13]. Применение наночастиц благородных металлов (преимущественно серебра и золота) позволяет преодолеть основное ограничение обычной спектроскопии комбинационного рассеяния – слабый сигнал. Наночастицы генерируют мощный эффект поверхностного усиления за счет плазмонного резонанса, что приводит к гигантскому увеличению интенсивности сигнала комбинационного рассеяния от молекул, адсорбированных на их поверхности или находящихся вблизи нее [14]. В методологии гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) в приложении к детекции бактерий следует четко различать два основных подхода. Первый – непосредственная регистрация сигнала комбинационного рассеяния от бактерий, смешанных с наночастицами, а также использование металлических и неметаллических наноструктурированных субстратов поверхностно-усиленных ГКР-платформ [15]. Второй – использование так называемых ГКР-меток, которые представляют собой плазмонные наночастицы с инкорпорированными или адсорбированными репортерными молекулами [16]. Данные метки имеют высокую интенсивность КР и четко известные спектральные линии. При их взаимодействии с бактериальными клетками теперь исследуется не сам сигнал от бактерий, а сигнал от меток. В некотором смысле методология ГКР-меток похожа на флуоресцентное окрашивание, только с использованием более ярких и фотостабильных красителей.

Цель настоящего исследования – создать быструю и экспериментально простую методику ГКР-спектроскопического определения числа бактериальных клеток штаммов *S. aureus* 209p и *E. coli* K12 в воде с использованием в качестве меток золотых нанозвезд и наностержней, покрытых репортерной молекулой – 4-нитротиофенолом.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы

В работе использовали следующие реагенты: аммиак (30% водный раствор), 4-нитротиобензол, цитрат натрия, цетилтрииметиламмоний бромид (ЦТАБ, 98%, Fluka), L-аскорбиновая кислота (АК, >99,9%), соляная кислота (HCl, 37 масс. % в воде), были получены из Sigma-Aldrich; тригидрат тетрахлораутрат (III) водорода ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, в рукописи представлен как 3ХВК – золотохлористоводородная кислота) и нитрат серебра (AgNO_3 , >99%) были приобретены у Alfa Aesar. В работе использовали 96% этиловый спирт (Кировский БиоХим завод) и деионизованную воду, очищенную с помощью системы Milli-Q Integral 5.

Синтез золотых наностержней

Наностержни получали с использованием двухстадийного метода на мицеллярных матрицах [17]. На первом этапе были синтезированы зародышевые ЦТАБ стабилизированные золотые наночастицы диаметром 1–3 нм. В колбу, содержащую 10 мл 100 мМ ЦТАБ, при перемешивании 1000 об/мин на магнитной мешалке добавляли 250 мкл 10 мМ раствора 3ХВК. Затем путем однократного быстрого (в течение 1–2 с) добавления в реакционную смесь вносили 600 мкл 10 мМ свежеприготовленного раствора борогидрида натрия. Перемешивали 2 мин и оставляли раствор при 30°C на 2 ч для полного разложения избытка борогидрида натрия. Получали светло-коричневый раствор золотых ЦТАБ стабилизированных золотых «зародышей», которые были использованы для получения золотых наностержней.

Для получения золотых наностержней в колбу, содержащую 60 мл 100 мМ ЦТАБ, добавляли последовательно 240 мкл 10 мМ нитрата серебра, 3 мл 10 мМ 3ХВК, 600 мкл 1 М соляной кислоты и 480 мкл 100 мМ аскорбиновой кислоты. В приготовленную таким образом ростовую смесь ввели путем однократного быстрого добавления 120 мкл полученных ранее золотых «зародышей». Реакционный раствор аккуратно встряхивали и оставляли на ночь в термостате при 30°C. В результате реакции раствор окрашивался в сине-серый цвет. Полученный продукт центрифугировали дважды при 9000 об/мин в течение 15 мин, осадок ресуспенсировали в 60 мл 20 мМ ЦТАБ.

Синтез золотых нанозвезд

Для получения золотых нанозвезд был использован протокол перероста с использованием квазисферических наночастиц, полученных с использованием цитрата натрия в качестве восстановителя [18]. Для этого в колбу наливали 60 мл деионизированной воды, затем по очереди добавляли 1.5 мл 1% 3ХВК, далее 180 мкл 1 М соляной кислоты, 4.8 мл коллоида золота со средним размером частиц равным 15 нм [19], прикалывали по 900 мкл 4 мМ нитрата серебра и 100 мМ аскорбиновой кислоты. Перемешивание продолжали 30 с, в результате получали коллоид золотых нанозвезд синего цвета. Готовый продукт центрифугировали дважды при 5500 об/мин в течении 15 мин, с ресуспенсированием в 20 мМ ЦТАБ, при этом получали 60 мл частиц.

Получение ГКР-меток

Для изготовления целевой ГКР-метки полученные золотые наночастицы (нанозвезды или наностержни) функционализировали 4-нитротиобензолом, ко-валентно связывающимся с поверхностью золотых наночастиц через тиольную группу и выступающим в роли репортерной молекулы [24]. Для этого 60 мл наночастиц смешивали с 600 мкл 2 мМ спиртового раствора тиолированной ароматической молекулы. Реакционную смесь выдерживали 30 мин. Полученные ГКР-метки центрифугировали и отмывали три раза

водой и ресуспендировали в 2 мМ ЦТАБ. Функционализация приводила к сдвигу положения максимума плазмонного резонанса наночастиц на 7 нм в длинноволновую область и появлению в ГКР спектре наиметок характерного пика вибрации нитрогруппы в области 1340 cm^{-1} .

Характеризация образцов

Измерения спектров экстинкции выполнены на спектрофотометре Specord S300 (Analytik Jena, Германия). Диапазон длин волн составил 320–1100 нм, использовались кварцевые кюветы с длиной оптического пути 2 и 10 мм. Исследования микро- и нано-структур, используемых в работе, проведены на просвечивающем электронном микроскопе (ПЭМ) Libra-120 (Carl Zeiss, Германия) в Центре коллективного пользования «Симбиоз» при ИБФРМ РАН (Саратов).

Измерения зависимости ГКР сигнала от концентрации бактерий

В качестве исследуемых бактериальных культур были использованы штаммы *E. coli* K12 и *S. aureus* 209p. Используемые штаммы выращивали в течение 12 ч на питательной богатой среде LB (Luria-Bertani). 2 мл бактериальной суспензии осаждали центрифугированием (5000 g, 5 мин), полученный осадок однократно отмывали натрий-фосфатным буфером (рН 7.2). Отмытые бактериальные клетки ресуспендировали в дистиллированной воде до начальной оптической плотности (далее ОП) – 0.9 в кювете с длиной оптического пути 1 см при длине волны 420 нм. Длина волны была подобрана экспериментально, количество бактериальных клеток в суспензиях, измеренных при 420 нм, оптимально подходило для взаимодействия с используемой концентрацией наночастиц. Затем готовили серию разведений бактериальных суспензий с шагом 3. ОП бактериальных суспензий в эксперименте были следующими: 0.9; 0.3; 0.1; 0.03; 0.01, что соответствует количеству бактериальных клеток КОЕ/мл: 10^7 ; 3×10^6 ; 10^6 ; 3×10^5 ; 10^5 . Кривые зависимости оптической плотности от количества бактериальных клеток, полученные методом высея КОЕ на плотную питательную среду, представлены в приложении (Рис. А1).

ГКР-метки адсорбировались на поверхность бактерий путем смешивания чистых бактериальных культур с переменным составом по числу бактерий с различными ГКР-метками постоянной концентрации по золоту (100 мкг/мл) в объемном соотношении 1 : 1 в течение 30 мин при комнатной температуре. Центрифугирование комплекса проводилось при 1000 об/мин в течение 10 мин. Полученные осадки, содержащие бактерии с адсорбированными ГКР-метками, ресуспендировали в 1 мМ ЦТАБ. Измерения ГКР сигнала проводились в 1-см кварцевой кювете с использованием спектрометра KР Peak Seeker Pro 785 (Ocean Optics) при излучении с длиной волны 785 нм, мощностью 30 мВт и времени накопления сигнала 30 с. Спектры каждого варианта усреднялись по результатам трех измерений в трех повторностях.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеризация ГКР-меток

Синтезированные ГКР-метки были охарактеризованы методами просвечивающей электронной микроскопии, спектрофотометрии и спектроскопии комбинационного рассеяния.

На Рис. 1а показан спектр экстинкции ГКР-меток на основе золотых нанозвезд. Максимум в спектре находится на длине волны 750 нм, что близко к используемой в работе длине волны лазерного излучения 785 нм. Данные электронной микроскопии для образца нанозвезд показаны на вставке в панель (в). Для золотых нанозвезд принято говорить не о среднем размере как таковом, а о группе геометрических параметров, таких как средний размер ядра, длина и число лучей. Средний размер ядра синтезированных наночастиц составлял 43 ± 5 нм, длина лучей 33 ± 8 нм и число лучей от 7 до 20. В полном согласии с нашими предыдущими данными [20] плазмонный резонанс таких частиц находится в области 720–760 нм. На Рис. 1б представлен спектр экстинкции для ГКР-меток на основе золотых наностержней. Спектр имеет два характерных максимума. Один в области 510–530 нм, а положение второго зависит от осевого отношения наностержней. В нашей работе максимум продольного плазмонного резонанса составлял 685 нм, что, согласно [21], соответствует осевому отношению 2.7. Это подтверждается данными электронной микроскопии (вставка на панели (г)), согласно которым длина наностержней составляет 49 ± 5 нм, а толщина 18.5 ± 2 нм.

Для обоих видов ГКР-меток наблюдалось высоконтенсивное комбинационное рассеяние с характерными линиями, соответствующими нитротиобензолу. В частности, [22] в исследуемом спектральном диапазоне наблюдается пик, связанный с вибрацией C–S связи при 730 cm^{-1} , двойной пик, определяемый колебаниями (C6–C1–C2)+(C3–C4–C5) при 1070 cm^{-1} и вибрацией бензольного кольца при 1058 cm^{-1} , вибрацией C–H связи совместно с колебаниями (C2–C3)+(C5–C6) при 1177 cm^{-1} , и наиболее выраженный пик, определяемый вибрацией нитрогруппы при 1343 cm^{-1} . Далее при обсуждении интенсивности комбинационного рассеяния мы будем оперировать значениями относительной интенсивности именно этой линии. Следует отметить, что сигнал ГКР от меток на основе нанозвезд был в несколько раз сильнее, чем от наностержней (12 000 относительных единиц против 3800 для наших условий измерения, Рис. 1в, 1г). Это связано с несколькими факторами. Во-первых, нанозвезды имеют острые «шипы», кривизна поверхности у остия нанозвезды составляет около 1 нм, в то время как для наностержней радиус кривизна полусферических концов равен 5–10 нм [23]. Во-вторых, для исследуемых образцов нанозвезд наблюдалось более точное соответствие длины волны плазмонного резонанса с длиной волны используемого лазера, что приводит к большему усилинию

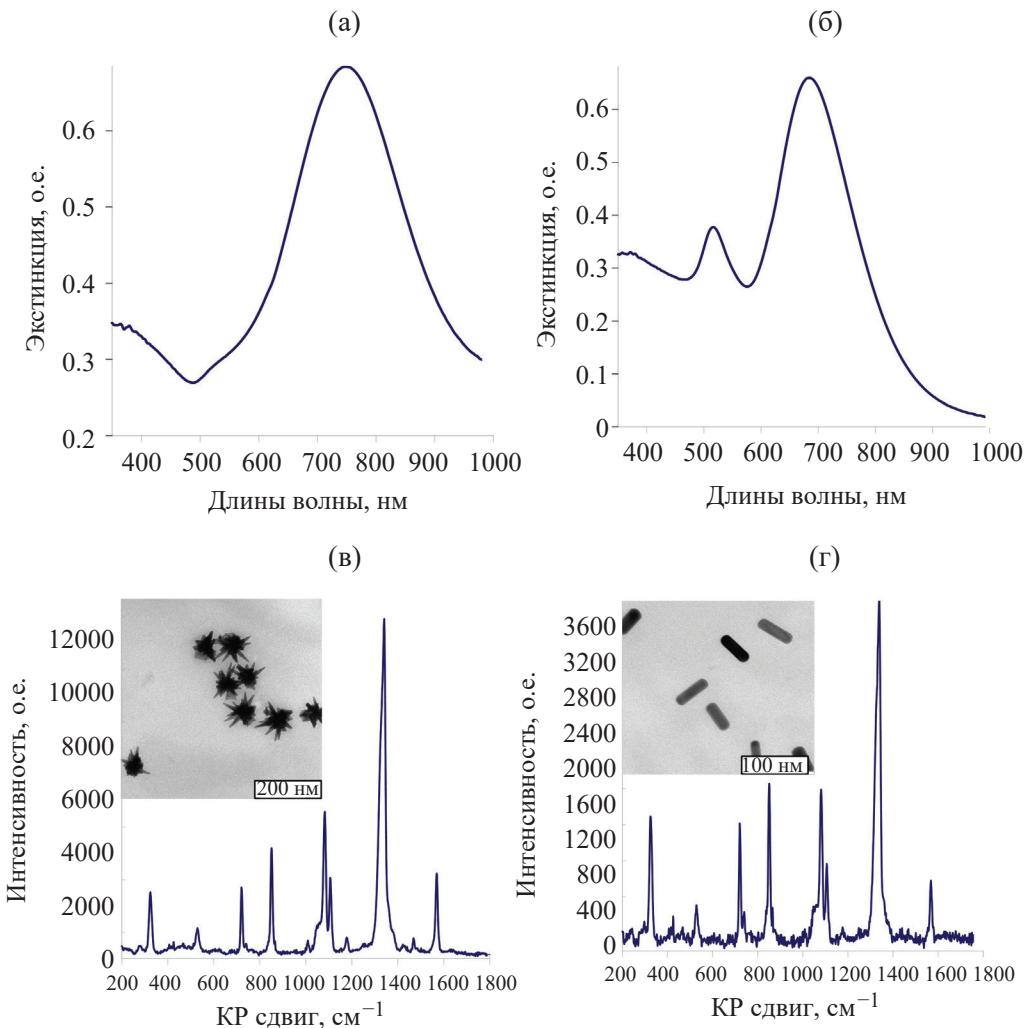


Рис. 1 Спектры экстинкции золотых нанозвезд (а) и наностержней (б). Спектры комбинационного рассеяния, измеренные от ГКР-меток на основе золотых нанозвезд (в) и наностержней (г). На вставках показаны соответствующие электронно-микроскопические изображения наночастиц. Размерные шкалы равны 200 (в) и 100 нм (г).

Fig. 1. Extinction spectra of gold nanostars (a) and nanorods (b). Raman spectra of SERS tags based on gold nanostars (c) and nanorods (d). Insets show corresponding electron micrographs of nanoparticles. Size scales are 200 (c) and 100 nm (d).

локального поля вблизи поверхности частицы [24]. И наконец, развитая поверхность нанозвезд позволяет адсорбировать большее число репортерных молекул при одинаковой концентрации золота в образцах.

Исследование зависимости ГКР сигнала нанометок от числа бактериальных клеток *S. aureus* 209p

Одним из штаммов бактерий для проведения наших исследований был выбран *Staphylococcus aureus* 209p. Это грамположительные кокки, представляющие собой округлые, неподвижные, не спорообразующие клетки. Является хорошо изученным лабораторным штаммом, который часто используется в научных исследованиях и адаптирован для использования в микробиологических лабораториях.

Исследование интенсивности ГКР сигнала нанометок от числа бактерий в культуре проводилось двумя способами: (а) измерение сигнала от смеси меток и бактерий сразу после адсорбции наночастиц; (б) центрифугирование смеси с измерением сигнала от ресуспендированного осадка, содержащего только бактерии с адсорбированными на их поверхности нанометками. Для исследований использовались суспензии бактерий с заранее известным числом клеток от 10^5 до 10^7 клеток в мл. Независимый контроль числа бактерий проводился по измерению оптической плотности и по подсчету КОЕ при посеве на твердой питательной среде. Для исследования использовались коллоиды ГКР-меток с концентрацией золота 100 мкг/мл, что соответствовало оптической

плотности на длине волны плазмонного резонанса 3.6 для нанозвезд и 4.4 для наностержней. Предполагается, что смешение бактерий с ГКР-метками будет приводить к неспецифической адсорбции последних на клеточной поверхности. Действительно, бактериальные клетки имеют при нейтральном pH отрицательный дзета-потенциал около -30 мВ, в то время как стабилизированные цетил trimetilаммоний бромидом ГКР-метки имеют дзета-потенциал $+40$ мВ. Следует отметить, что в нашей методике использовался значительный числовой избыток

ГКР-меток. В используемых коллоидах содержалось 10^{10} – 10^{11} наночастиц в мл, то есть на одну бактерию приходилось как минимум 100 нанометок.

На Рис. 2 показаны спектры ГКР от нанозвезд в смеси с суспензией бактерий с различной числовой концентрацией. Данные показаны для измерений как в простой смеси (панель (а)), так и после отделения несвязавшихся наночастиц (панель (б)). В обоих случаях видна зависимость ГКР сигнала от концентрации бактерий, причем для случая простого смешивания наблюдается обратная зависимость (чем больше

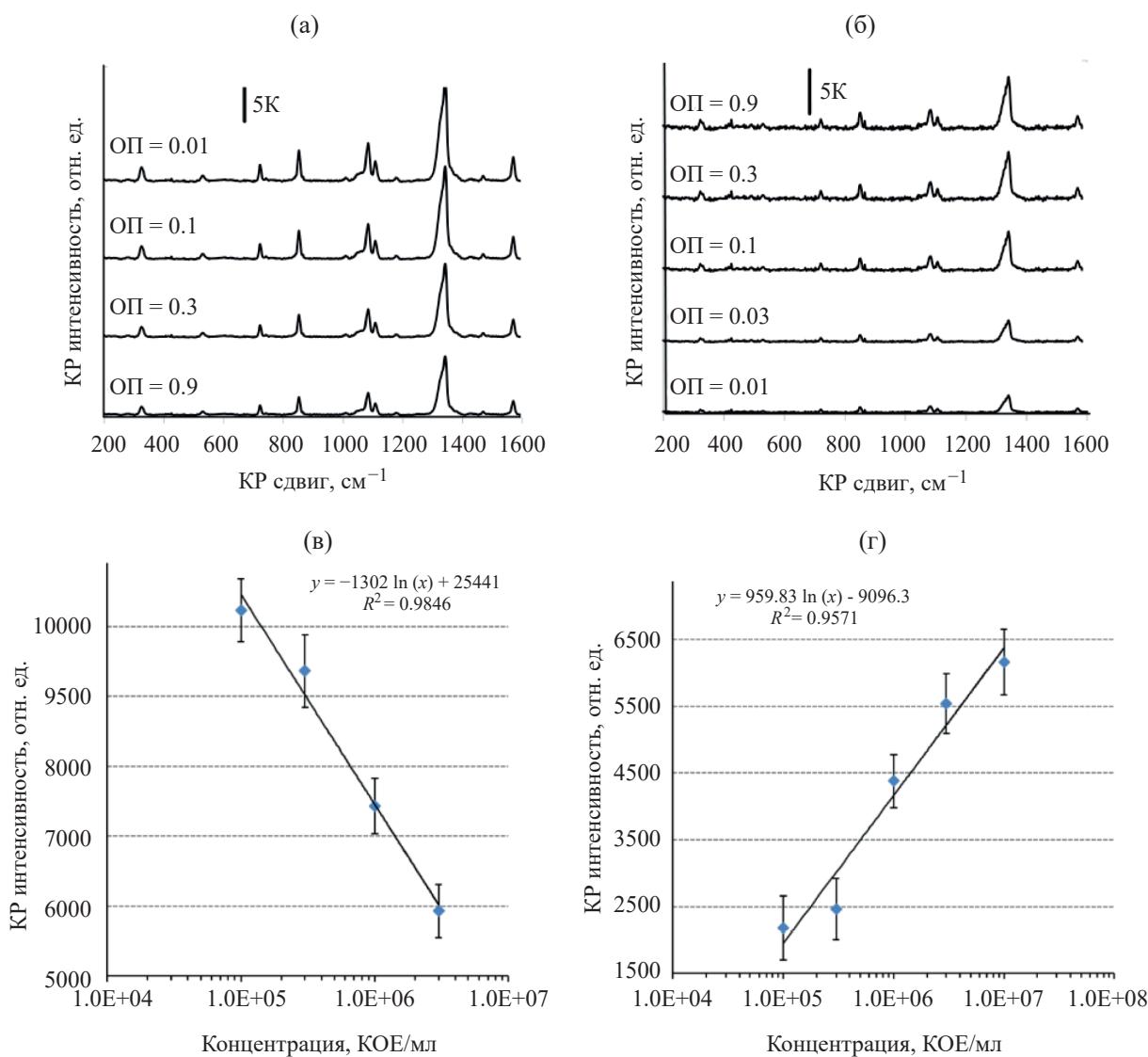


Рис. 2. ГКР спектры смеси бактерий и ГКР-меток на основе нанозвезд до центрифугирования (а) и измеренные при ресуспензировании осадка (б). Данные представлены для бактериальной культуры с оптической плотностью в интервале 0.01–0.9. Зависимость ГКР сигнала от числа клеток *S. aureus* 209p в суспензии до центрифугирования (в) и после в осадке (г). Бары представлены доверительным интервалом для $p = 0.05$; $n = 9$.

Fig. 2. SERS spectra measured for mixture of bacteria and nanostar-based SERS tags before centrifugation (a) and after resuspension of precipitate (b). The data are presented for bacterial culture with optical density of 0.01–0.9. Dependences of SERS signals on the number of *S. aureus* 209p cells in suspension before centrifugation (c) and after centrifugation in precipitate (d). Bars denote confidence intervals for $p = 0.05$; $n = 9$.

бактерий, тем меньше сигнал), а для случая исследования осадка – прямая (чем больше бактерий, тем больше сигнал). Наличие зависимости интенсивности сигнала ГКР от концентрации бактерий позволяет построить калибровочные кривые. Примеры таких кривых, построенные для двух вариантов реализации методики, показаны на Рис. 2в, 2г. Оба подхода продемонстрировали наличие полулогарифмической зависимости интенсивности пика ГКР-меток от количества бактерий в исследуемой чистой культуре. Аналогичные данные были получены при использовании другого вида ГКР-меток на основе золотых наностержней (Приложение, Рис. А2). В качестве отличия можно отметить в три раза более низкую интенсивность сигнала при любой концентрации исследуемых бактерий, что отлично согласуется с данными характеризации нанометок (Рис. 1в, 1г).

Использование нанозвезд в качестве ГКР-меток в экспериментах без осаждения комплекса продемонстрировало наилучшую воспроизводимость от опыта к опыту и показало высокий коэффициент детерминации полулогарифмической зависимости порядка 0.99 (Рис. 2в). В то время как коэффициент корреляции для случая измерения после отмычки от несвязавшихся частиц составлял 0.96. При использовании наностержней в качестве ГКР-меток значения коэффициента корреляции были 0.93 и 0.95 соответственно. Объяснение данного феномена связано с различной структурой комплексов

наночастиц, адсорбированных на бактериях. Изучая электронно-микроскопические изображения ГКР-меток на поверхности бактерий, можно констатировать более полную и равномерную адсорбцию нанозвезд по всей поверхности круглых кокков (Рис. 3а) по сравнению с наностержнями (Рис. 3б), что подтверждает наблюдаемые нами закономерности при измерении ГКР сигналов, особенно в условиях прямых измерений, без отделения несвязавшихся нанометок. В целом коэффициент детерминации уравнения регрессии, полученный в результате измерений ГКР сигнала, от коньюгатов *S. aureus* 209р во всех экспериментах был не ниже 0.93.

*Исследование зависимости ГКР сигнала нанометок от числа бактериальных клеток *E. coli* K12*

Еще одним бактериальным штаммом, который мы использовали в работе, был *Escherichia coli* K12 – одна из самых известных и широко используемых в лабораторных исследованиях модельных бактерий. Это грамотрицательные, короткие, подвижные (в некоторых случаях) палочки, адаптированные для лабораторного использования в научных исследованиях.

На Рис. 4 показаны спектры ГКР от нанозвезд в смеси с суспензией бактерий *E. coli* K12 с различной числовой концентрацией. Данные показаны для измерений как в простой смеси (панель (а)), так и после отделения несвязавшихся наночастиц (панель (б)).

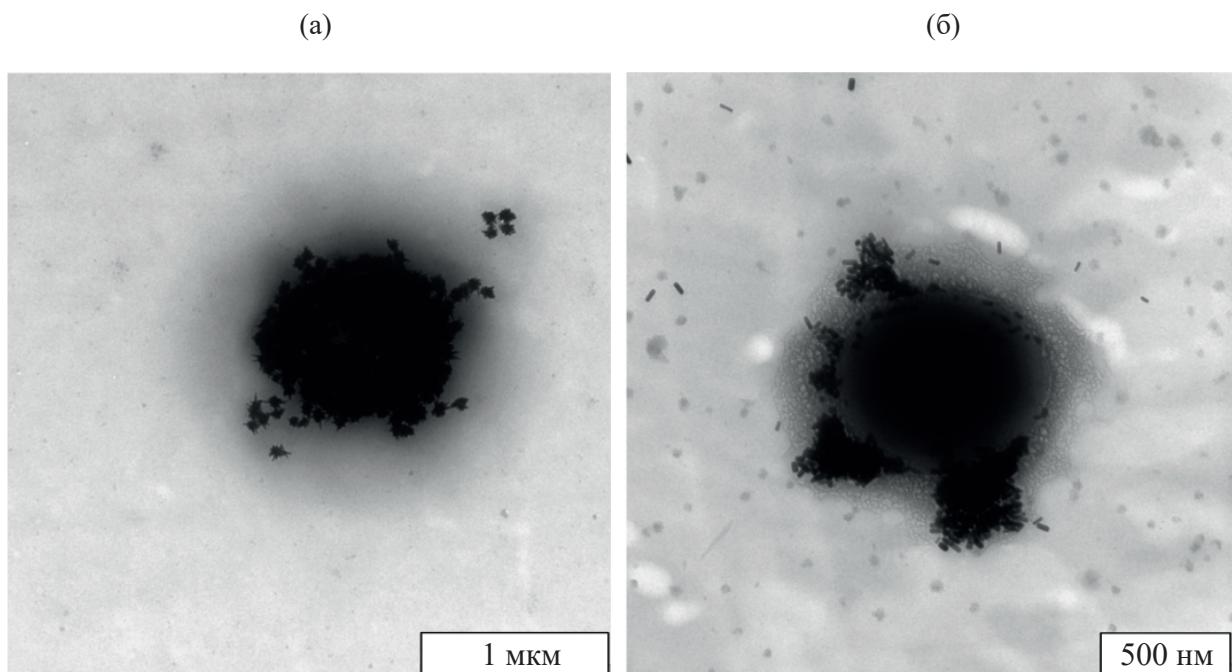


Рис. 3 Электронно-микроскопическое изображение ГКР-меток на основе золотых нанозвезд (а) и наностержней (б) адсорбированных на поверхность бактерий *S. aureus* 209р. Масштабные линейки 1 мкм (а) и 500 нм (б).

Рис. 3 Electron micrographs of SERS tags based on gold nanostars (a) and nanorods (b) adsorbed on the surface of *S. aureus* 209p bacteria. Size scales are 1 μ m (a) and 500 nm (b).

При использовании нанозвезд как в случае комплексов *S. aureus* 209p, так и *E. coli* K12, в условиях прямых измерений без удаления несвязавшихся частиц, наблюдались высокая воспроизводимость и высокий коэффициент детерминации полулогарифмической зависимости порядка 0.99 (Рис. 4в). Для варианта методики, основанном на измерении после отделения несвязавшихся нанозвезд, коэффициент корреляции снова был равен 0.95. Аналогичные данные зафиксированы при применении другого варианта

ГКР-меток, использующих золотые наностержни (Приложение, Рис. А3). Кроме того, проводя анализ электронно-микроскопических изображений, для нанозвезд в большинстве наблюдаемых нами случаях характерно более равномерное распределение наночастиц по поверхности клеток, в отличие от локально-точечного для наностержней (Рис. 5). Это может быть объяснено особенностями морфологии этих двух типов наночастиц. А именно наличие у стержней больших по площади продольных граней приводит

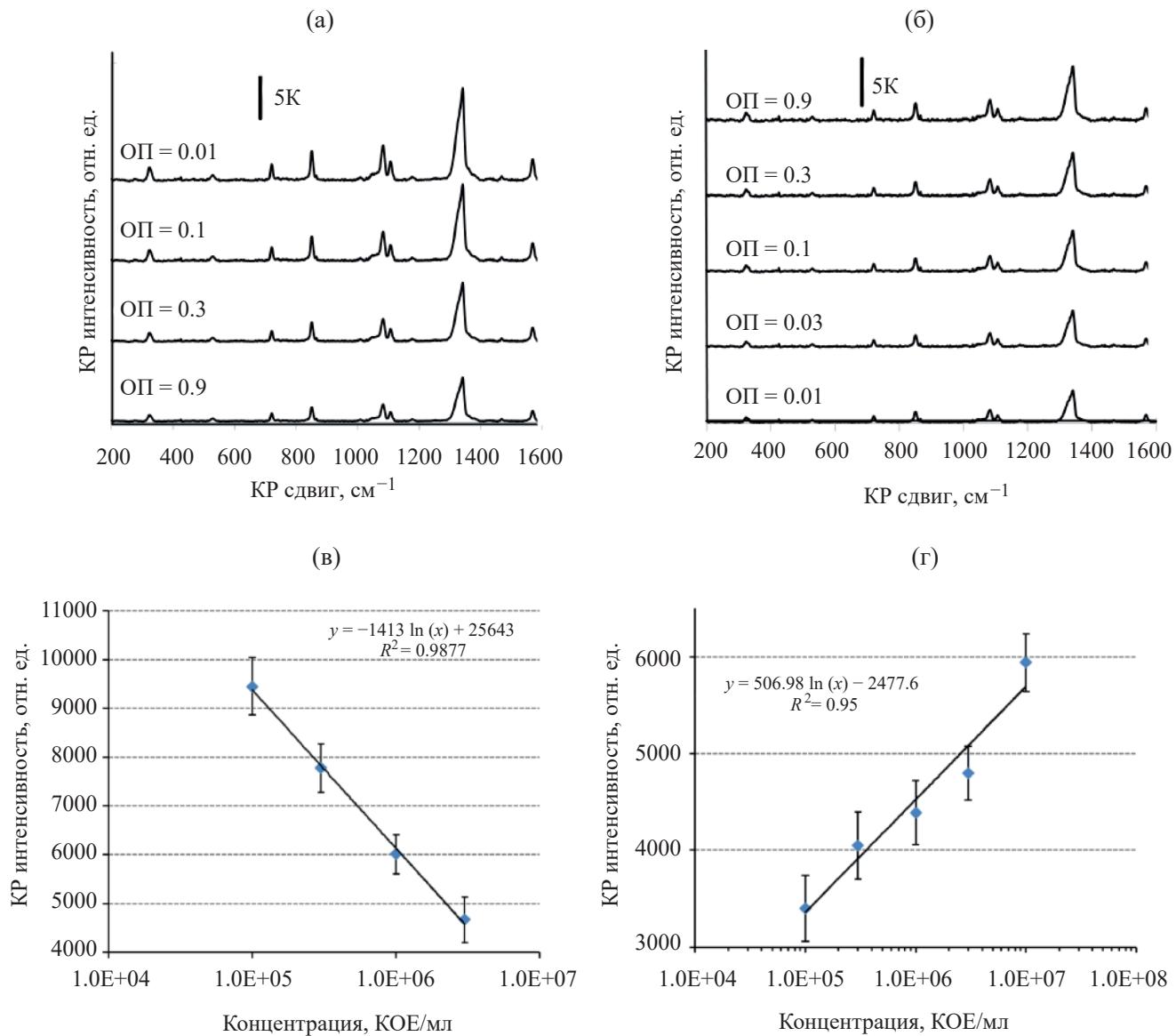


Рис. 4 ГКР спектры смеси бактерий и ГКР-меток на основе нанозвезд до центрифугирования (а) и измеренные при ресуспендривании осадка (б). Данные представлены для бактериальной культуры с оптической плотностью в интервале 0.01–0.9. Зависимость ГКР сигнала от числа клеток *E. coli* K12 в супензии до центрифугирования (в) и после в осадке (г). Бары представлены доверительным интервалом для $p = 0.05$; $n = 9$.

Рис. 4 SERS spectra measured for mixture of bacteria and nanostar-based SERS tags before centrifugation (a) and after resuspension of precipitate (b). Data are presented for bacterial culture with optical density of 0.01–0.9. Dependences of SERS signals on the number of *E. coli* K12 cells before centrifugation in suspension (c) and after centrifugation in precipitate (d). Bars denote confidence intervals interval for $p = 0.05$; $n = 9$.

к локализованной адсорбции при электростатическом взаимодействии нанометок с бактериальной поверхностью, что, напротив, зачастую не характерно для объемных квазисферических нанозвезд, содержащих шипы.

Во всех наблюдаемых зависимостях коэффициент детерминации уравнения регрессии, полученном в результате измерений ГКР сигнала от коньюгатов *E. coli* K12, был не ниже 0.95.

Таким образом, все вышеописанные эксперименты с различными вариациями клеток и наночастиц могут говорить об универсальности метода оценки количества бактериальных клеток с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния.

ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам экспериментов мы обнаружили зависимость ГКР сигнала от концентрации бактериальных клеток как при простом смешивании с ГКР-метками, так и при отделении несвязавшихся частиц. Несмотря на то, что метод измерения сигнала от осадка бактериального комплекса после центрифугирования является более логичным с точки зрения механизма взаимодействия культур с ГКР-метками, а именно удаление супернатанта несвязанных нанометок позволяет не учитывать их роль в формировании общего сигнала. Это подтверждается тем, что во всех экспериментах мы наблюдали рост

ГКР сигнала с увеличением бактериальных клеток в коллоиде. При высоких концентрациях клеток в образовании комплекса и формировании конечного измеряемого осадка принимали участие практически все добавляемые нанометки, что выражалось в высоком уровне сигнала. Напротив, уменьшение числа бактерий приводило к исключению большего количества нанометок в виде не измеряемого супернатанта и, как следствие, меньшему сигналу от осадка. Тем не менее достоверно показал себя метод измерения сигнала нанометок от готового бактериального комплекса до центрифугирования и отделения измеряемого осадка. В этом случае мы наблюдали обратное явление, а именно падение сигнала от увеличения концентрации бактериальной культуры. По нашему предположению, падение сигнала с увеличением количества клеток может происходить по ряду взаимосвязанных причин: (а) возрастает оптическая плотность коллоида, (б) возрастает вероятность экранирования нанометок бактериальными клетками, что в обоих случаях приводит к рассеянию лазерного излучения и, как следствие, к снижению эффективности возбуждения излучения и снижению сигнала комбинационного рассеяния. В наших экспериментах предполагаемые явления прямо коррелируют с концентрациями бактериальных культур, что, в свою очередь, отражается на уровне сигнала от репортерных молекул.

Существенным техническим недостатком нашей реализации методики ГКР измерений в осадке была

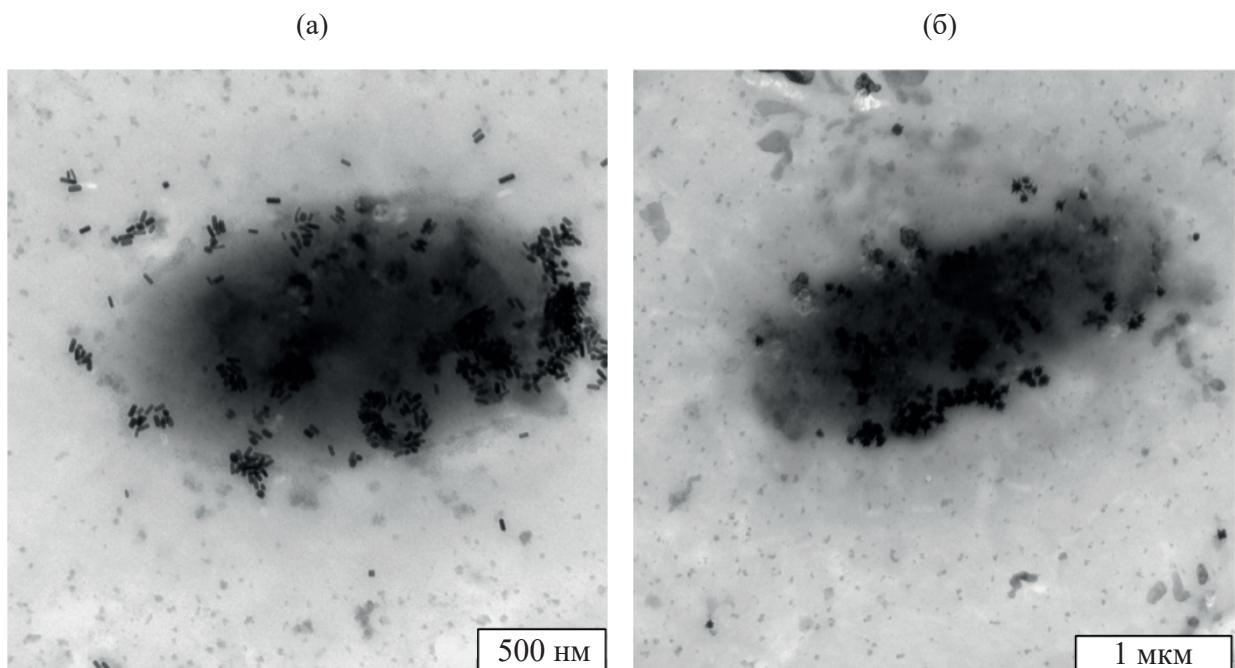


Рис. 5 Электронно-микроскопическое изображение ГКР-меток на основе золотых наностержней (а) и нанозвезд (б) адсорбированных на поверхности бактерий *E. coli* K12 (масштабные линейки 500 нм (а) и 1 мкм (б)).

Рис. 5 Electron micrographs of SERS tags based on gold nanorods (a) and nanostars (b) adsorbed on the surface of *E. coli* K12 bacteria (size scales are 500 nm (a) and 1 μ m (b)).

невозможность полного отделения несвязавшихся меток в результате центрифугирования. При небольшом (менее 10^5 клеток/мл) количестве бактерий в результате центрифугирования частично осаждались и несвязавшиеся метки. Подбор условий центрифугирования, такой как уменьшение ускорения или увеличение времени осаждения, не позволял полностью разделять бактерии и метки. Повторное центрифугирование приводило к тому, что осадок был настолько мал, что его было невозможно наблюдать на дне центрифужной пробирки. Это приводило к ошибкам при отборе образца. Мы заметили, что при использовании ГКР-меток на основе золотых наностержней осаждение несвязавшихся меток было меньше за счет меньшего среднего размера частиц по сравнению с нанозвездами. Таким образом, решение указанной проблемы может быть в использовании частиц с минимально возможными размерами (10–15 нм).

Далее следует обсудить диапазон и порог детекции используемой методики. В нашем случае мы исследовали суспензии, содержащие 10^7 – 10^5 клеток/мл. Очевидно, что расширение диапазона детекции в большую сторону не является актуальной задачей, так как для таких концентраций бактерий отлично работают простые спектрофотометрические методики. С другой стороны, определение концентраций в диапазоне ниже 10^5 клеток/мл с использованием спектрофотометра затруднительно из-за низкой оптической плотности. ГКР-методика, в свою очередь, не имеет такого ограничения. Для расширения рабочего диапазона

и снижения порога детекции необходима миниатюризация детектирующей ГКР-системы, например, переход на режим ГКР-микроскопии со сканированием образца. В данном случае порог детекции может быть снижен вплоть до единичных бактерий в образце. Наконец, переход от модельных экспериментов на чистых культурах к работе с реальными образцами потребует модификации методики и работы с коньюгатами ГКР-меток с узнающими молекулами (антителами, аптамерами) вместо простого электростатического связывания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана методика быстрой и простой детекции определения числа бактерий штаммов *S. aureus* 209p и *E. coli* K12 на основе непрямой ГКР-спектроскопии с метками на основе золотых нанозвезд и наностержней, меченных репортерной молекулой 4-нитротиобензолом. Метод демонстрирует высокую воспроизводимость и универсальность. Несмотря на существующие ограничения, в первую очередь по диапазону определяемых концентраций и необходимости работы с чистыми культурами результаты работы открывают перспективы для создания на этой основе новых экспресс-тестов для микробиологической диагностики, контроля эффективности antimикробной терапии и решения задач в биотехнологии. Дальнейшее развитие метода должно быть направлено на повышение его чувствительности, специфичности и применимости к сложным биологическим матрицам.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *La Rosa R., Johansen H.K., Molin S.* Persistent bacterial infections, antibiotic treatment failure, and microbial adaptive evolution // *Antibiotics*. 2022. V. 11. № 3. P. 419. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11030419>
2. *Eubank T.A., Long S.W., Perez K.K.* Role of rapid diagnostics in diagnosis and management of patients with sepsis free // *The Journal of Infectious Diseases*. 2020. V. 222. № 2. P. S103–S109. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa263>
3. *Kabiraz M.P., Majumdar P.R., Mahmud M.C., Bhowmik S., Ali. A.* Conventional and advanced detection techniques of foodborne pathogens: a comprehensive review // *Helijon*. 2023. V. 9. № 4. P. e15482. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e15482>
4. *Skogman M.E., Vuorela P.M., Fallarero A.* Combining biofilm matrix measurements with biomass and viability assays in susceptibility assessments of antimicrobials against *Staphylococcus aureus* biofilms // *The Journal of Antibiotics*. 2012. V. 65. P. 453–459. <https://doi.org/10.1038/ja.2012.49>
5. *Zhang K., Cheng L., Imazato S., Antonucci J.M., Lin N.J., Lin-Gibson S., Bai Y., Xu H.H.K.* Effects of dual antibacterial agents MDPB and nano-silver in primer on microcosm biofilm, cytotoxicity and dentine bond properties // *J. Dent.* 2013. V. 41. № 5. P. 464–474. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.02.001>
6. *Dudak F.C., Boyaci I.H.* Rapid and label-free bacteria detection by surface plasmon resonance (SPR) biosensors // *Biotechnol. J.* 2009. V. 4. № 7. P. 1003–1011. <https://doi.org/10.1002/biot.200800316>
7. *Koseki S., Nonaka J.* Alternative approach to modeling bacterial lag time, using logistic regression as a function of time, temperature, pH, and sodium chloride concentration // *Appl. Environ. Microbiol.* 2012. V. 78. № 17. P. 6103–6112. <https://doi.org/10.1128/AEM.01245-12>

8. *Schacht V.J., Neumann L.V., Sandhi S.K., Chen L., Henning T., Klar P.J., Theophil K., Schnell S., Bunge M.* Effects of silver nanoparticles on microbial growth dynamics // *J. Appl. Microbiol.* 2013. V. 114. № 1. P. 25–35.
<https://doi.org/10.1111/jam.12000>
9. *Vital M., Dignum M., Magic-Knezev A., Ross P., Rietveld L., Hammes F.* Flow cytometry and adenosine triphosphate analysis: alternative possibilities to evaluate major bacteriological changes in drinking water treatment and distribution systems // *Water Res.* 2012. V. 46. № 15. P. 4665–4676.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.06.010>
10. *Zahavy E., Ber R., Gur D., Abramovich H., Freeman E., Maoz S., Yitzhaki S.* Application of nanoparticles for the detection and sorting of pathogenic bacteria by flow-cytometry // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012. V. 733. P. 23–36.
https://doi.org/10.1007/978-94-007-2555-3_3
11. *Rodriguez L., Zhang Zh., Wang D.* Recent advances of Raman spectroscopy for the analysis of bacteria // *Analytical Science Advances.* 2023. V. 4. № 3–4. P. 81–95.
<https://doi.org/10.1002/ansa.202200066>
12. *Zhou X., Hu Z., Yang D., Xie Sh., Jiang Zh., Niessner R., Haisch C., Zhou H., Sun P.* Bacteria detection: from powerful SERS to its advanced compatible techniques // *Advanced Science.* 2020. V. 7. № 23. P. 2001739.
<https://doi.org/10.1002/advs.202001739>
13. *Tadesse L.F., Safir F., Ho C.-S., Hasbach X., Khuri-Yakub B., Jeffrey S.S., Saleh A.A.E., Dionne J.* Toward rapid infectious disease diagnosis with advances in surface-enhanced Raman spectroscopy // *J. Chem. Phys.* 2020. V. 152. P. 240902.
<https://doi.org/10.1063/1.5142767>
14. *Yi J., You E.-M., Hu R., Wu D.-Y., et al.* Surface-enhanced Raman spectroscopy: a half-century historical perspective // *Chem. Soc. Rev.* 2025. V. 54. P. 1453–1551.
<https://doi.org/10.1039/D4CS00883A>
15. *Nazarovskaya D.A., Dominin P.A., Gyuppenen O.D., Tsiniakin I.I., Ermolaeva S.A., Gonchar K.A., Osminkina L.A.* Advanced bacterial detection with SERS-active gold- and silver-coated porous silicon nanowires // *Bull. Russ. Acad. Sci. Phys.* V. 87 (Suppl 1). 2023. V. 87. P. S41–S46.
<https://doi.org/10.1134/S1062873823704385>
16. *Liu H., Gao X., Xu Ch.* SERS tags for biomedical detection and bioimaging // *Theranostics.* 2022. V. 12. № 4. P. 1870–1903.
<https://doi.org/10.7150/thno.66859>
17. *Nikoobakht B., El-Sayed M.A.* Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method // *Chem. Mater.* 2003. V. 15. № 10. P. 1957–1962.
<https://doi.org/10.1021/cm0207321>
18. *Khoury C.G., Vo-Dinh T.* Gold nanostars for surface-enhanced Raman scattering: synthesis, characterization and optimization // *J. Phys. Chem. C. Nanomater Interfaces.* 2008. V. 112. P. 18849–18859.
<https://doi.org/10.1021/jp8054747>
19. *Дыкман Л.А., Богатырев В.А., Щеголев С.Ю., Хлебцов Н.Г.* Золотые наночастицы: синтез, свойства, биомедицинское применение. 2008. 319 с.
20. *Иноземцева О.А., Приходженко Е.С., Карташова А.М., Тюнина Ю.А., Захаревич А.М., Буров А.М., Хлебцов Б.Н.* ГКР-метки на основе силикатных микрочастиц с адсорбированными золотыми нанозвездами // Коллоидный журнал. 2024. Т. 86. № 6. С. 742–755.
<https://doi.org/10.31857/S0023291224060078>
21. *Khlebtsov B.N., Khanadeev V.A., Ye J., Sukhorukov G.B., Khlebtsov N.G.* Overgrowth of gold nanorods by using a binary surfactant mixture // *Langmuir.* 2014. V. 30. № 6. P. 1696–1703.
<https://doi.org/10.1021/la404399n>
22. *Khlebtsov N.G., Lin L., Khlebtsov B.N., Ye J.* Gap-enhanced Raman tags: fabrication, optical properties, and theranostic applications // *Theranostics.* 2020. V. 10. № 5. P. 2067–2094.
<https://doi.org/10.7150/thno.39968>
23. *Khlebtsov B., Khanadeev V., Pylaev T., Khlebtsov N.* A new T-matrix solvable model for nanorods: TEM-based ensemble simulations supported by experiments // *J. Phys. Chem. C.* 2011. V. 115. № 14. P. 6317–6323.
<https://doi.org/10.1021/jp2000078>
24. *Khlebtsov B.N., Khanadeev V.A., Burov A.M., Le Ru E.C., Khlebtsov N.G.* Reexamination of surface-enhanced Raman scattering from gold nanorods as a function of aspect ratio // *J. Phys. Chem. C.* 2020. V. 124. № 19. P. 10647–10658.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c00991>