

doi: 10.17586/2226-1494-2023-23-4-676-684

УДК 535.8

Спектроскопия комбинационного рассеяния света в исследованиях процессов инактивации бактериальных микроорганизмов

Карина Игоревна Матвеева^{1✉}, Анна Анатольевна Кундалевич²,
Анастасия Ивановна Капитунова³, Александр Сергеевич Зозуля⁴,
Станислав Алексеевич Сухих⁵, Анна Владимировна Цибульникова⁶,
Андрей Юрьевич Зюбин⁷, Илья Геннадьевич Самусев⁸

^{1,2,3,4,5,6,7,8} Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта, Калининград, 236041, Российская Федерация

¹ matveeva.k.i@inbox.ru ✉, <https://orcid.org/0000-0003-2585-163X>

² Kundalevich3@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7428-6441>

³ AKapitunova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0958-6338>

⁴ zozul97@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5717-8625>

⁵ SSukhikh@kantiana.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7910-8388>

⁶ memorgold@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8578-0701>

⁷ azubin@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9766-1408>

⁸ ISamusev@kantiana.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5026-7510>

Аннотация

Введение. Спектроскопия комбинационного рассеяния света является одним из перспективных подходов для структурно-функциональных исследований биологических объектов, в том числе бактериальных микроорганизмов. Для бактериального анализа применяются традиционные биохимические тесты и генетические методы. Генетические методы требуют дорогостоящих реагентов, расходных материалов и являются времязатратными. Спектроскопические методы исследования позиционируются как неинвазивные, высокочувствительные и требующие минимальной пробоподготовки образцов. В представленной работе исследована возможность применения метода комбинационного рассеяния света, использующего оптические сенсоры на основе золотых анизотропных наночастиц. Применимость метода продемонстрирована на изучении влияния антибиотика цефалоспоринового ряда широкого спектра действия и экстракта калины (*Viburnum opulus L*) на колонии кишечной палочки (*Escherichia coli*). **Метод.** Применен метод спектроскопии комбинационного рассеяния света с использованием спектрометра Virsa (Renishaw). Усиление сигнала комбинационного рассеяния света проводилось с использованием предложенных авторами двух оригинальных оптических сенсоров. Для создания сенсоров выбраны химический метод осаждения нанозвезд золота на APTES-модифицированные кварцевые стекла и физический метод создания сенсоров, основанный на анодировании титановых поверхностей. **Основные результаты.** Полученные результаты показали высокую чувствительность и информативность предложенного метода. Подтверждена возможность использования метода комбинационного рассеяния света для исследования инактивации бактериальных микроорганизмов. Определены и идентифицированы спектральные полосы комбинационного рассеяния света *Escherichia coli* до и после воздействия экстракта калины и антибиотика в качестве контроля. Установлено уменьшение интенсивности спектральных мод, соответствующих аминокислотам и пуриновым метаболитам, в усредненном спектре комбинационного рассеяния света *Escherichia coli* после воздействия экстракта калины. **Обсуждение.** Впервые проведено исследование антимикробного эффекта водного экстракта плодов калины методом комбинационного рассеяния света. Показано, что применение растительных экстрактов, в том числе экстрактов плодов калины, для инактивации жизнедеятельности колоний бактерий является перспективным подходом по поиску новых альтернативных антибактериальных средств. Полученные результаты хорошо согласуются с уже известными научными исследованиями и подтверждают эффективность предложенного метода.

Ключевые слова

плазмонный резонанс, нанозвезды, КРС, *Viburnum opulus L.*, кишечная палочка, антибиотики

Благодарности

Работа выполнена при поддержке проекта государственного задания Минобрнауки Российской Федерации № FZWM-2020-0003 «Исследование новых материалов и методов плазмо- и фототерапии онкологических заболеваний, дерматитов и септических осложнений» 2020–2023 гг.

Ссылка для цитирования: Матвеева К.И., Кундалевич А.А., Капитунова А.И., Зозуля А.С., Сухих С.А., Цибульников А.В., Зюбин А.Ю., Самусев И.Г. Спектроскопия комбинационного рассеяния света в исследованиях процессов инактивации бактериальных микроорганизмов // Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики. 2023. Т. 23, № 4. С. 676–684. doi: 10.17586/2226-1494-2023-23-4-676-684

Application of Raman spectroscopy to study the inactivation process of bacterial microorganisms

Karina I. Matveeva^{1✉}, Anna A. Kundalevich², Anastasia I. Kapitonova³,
Aleksandr S. Zozulya⁴, Stanislav A. Sukhikh⁵, Anna V. Tsibulnikova⁶,
Andrey Yu. Zyubin⁷, Ilia G. Samusev⁸

^{1,2,3,4,5,6,7,8} Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, 236041, Russian Federation

¹ matveeva.k.i@inbox.ru✉, <https://orcid.org/0000-0003-2585-163X>

² Kundalevich3@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7428-6441>

³ AIKapitonova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0958-6338>

⁴ zozul97@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5717-8625>

⁵ SSukhikh@kantiana.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7910-8388>

⁶ memorgold@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8578-0701>

⁷ azubin@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9766-1408>

⁸ ISamusev@kantiana.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5026-7510>

Abstract

Raman spectroscopy (RS) is one of the promising approaches for structural and functional studies of various biological objects, including bacterial microorganisms. Both traditional biochemical tests and genetic methods which require expensive reagents, consumables and are time-consuming are used for bacterial analysis. Spectroscopic methods are positioned as noninvasive, highly sensitive, and requiring minimal sample preparation. In this work we investigated the possibility of using the RS method using optical sensors based on gold anisotropic nanoparticles. The applicability of the method was demonstrated by studying the effect of a broad-spectrum cephalosporin antibiotic and an extract of *Viburnum opulus L* (VO) on *Escherichia coli* (*E. Coli*) colonies. The studies were performed by Raman spectroscopy using a Virsa spectrometer (Renishaw). Raman signal amplification was carried out using two original optical sensors proposed by the authors. To create sensors, we used a chemical method of depositing gold nanostars on APTES-modified quartz glasses and a physical method for creating sensors based on anodizing titanium surfaces. The results of the study showed the high sensitivity and information content of the proposed method. The possibility of using the RS method for studying the inactivation of bacterial microorganisms is shown. Spectral Raman bands of *E. Coli* were determined and identified before and after exposure to VO extract and antibiotic as a control. A decrease in the intensity of spectral modes corresponding to amino acids and purine metabolites was found in the average Raman spectrum of *E. Coli* after exposure to VO extract. For the first time, a study of the antimicrobial effect of an aqueous extract of VO fruits was carried out by the method of Raman scattering. It has been shown that the use of plant extracts, including VO fruit extracts, to inactivate the vital activity of bacterial colonies is a promising approach to the search for new alternative antibacterial agents. The results obtained are in good agreement with the already known scientific studies and confirm the effectiveness of the proposed method.

Keywords

plasmon resonance, nanostars, SERS, *Viburnum opulus L.*, *Escherichia coli*, antibiotics

Acknowledgements

The work was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation State Assignment no. FZWM-2020-0003 “Research of new materials and methods of plasma and phototherapy of cancer, dermatitis, and septic complications” 2020-2023.

For citation: Matveeva K.I., Kundalevich A.A., Kapitonova A.I., Zozulya A.S., Sukhikh S.A., Tsibulnikova A.V., Zyubin A.Yu., Samusev I.G. Application of Raman spectroscopy to study the inactivation process of bacterial microorganisms. *Scientific and Technical Journal of Information Technologies, Mechanics and Optics*, 2023, vol. 23, no. 4, pp. 676–684 (in Russian). doi: 10.17586/2226-1494-2023-23-4-676-684

Введение

Появление в современной медицине противомикробных препаратов (антибиотики, противовирусные и противогрибковые препараты) позволило взять под кон-

троль развитие вирусных и бактериальных инфекций. С 1930 г. по 1962 г. было разработано более 20 классов антибиотиков [1], которые направлены на остановку синтеза белков и метаболитов, нарушение целостности клеточной стенки и процесса бинарного деления бак-

териальных микроорганизмов [2]. В настоящее время темпы разработок новых классов антибиотиков замедлились, однако их потребление увеличилось, что привело к появлению и быстрому распространению устойчивых к антибиотикам патогенов, особенно бактерий с множественной лекарственной устойчивостью [3]. Один из основных подходов к получению новых антимикробных агентов — поиск и адаптация натуральных продуктов, например растительных экстрактов, богатых фенолами и флавоноидами [4, 5]. По литературным данным, Всемирной организацией здравоохранения зарегистрированы названия более 20 000 видов лекарственных растений с различными потенциальными применениями, в том числе в качестве антибактериальных агентов [2]. Отметим, что известно применение экстрактов растений против бактерий, плесеней, насекомых, вирусов и опухолевых клеток в качестве фотосенсибилизаторов активной формы кислорода [6, 7].

Среди перспективных растительных антибактериальных агентов выделяются агенты растительного происхождения. Одним из перспективных природных агентов ввиду потенциальных антибактериальных свойств является *Viburnum opulus L.* Перспективность применения экстрактов на основе *Viburnum opulus L.* обусловлена наличием таких биологически активных компонентов как витамин С, каротиноиды, иридоиды, эфирные масла и фенольные соединения. Благодаря такому составу экстракт *Viburnum opulus L.* обладает антиоксидантной активностью, антимикробным потенциалом (особенно в отношении грамположительных бактерий), имеет доказанные противовоспалительные, противодействующие ожирению, антидиабетические, остеогенные, кардио- и цитопротекторные свойства [8–10].

Существует множество методов скрининга и оценки антимикробной активности, например: проточная цитофлуориметрия, биолюминесцентные и различные диффузионные методы [11]. В настоящее время активно развиваются оптические методы неинвазивного анализа чувствительности бактериальных клеток к противомикробным препаратам *in vitro*. Один из таких методов — метод комбинационного рассеяния света (КРС) и его частные случаи, как гигантское комбинационное рассеяние света (ГКРС) [12]. Данный метод — неинвазивен и позволяет получить информацию о химической структуре микробных клеток и биопленок без пробоподготовки исследуемых образцов. Метод ГКРС основан на явлении плазмонного резонанса, который можно наблюдать как на шероховатых металлических поверхностях [13], так и на металлических наночастицах [14]. Изменяя параметры наночастиц (материал, размер, геометрия) можно контролировать генерацию плазмонного резонанса и усиление сигнала КРС, что позволяет увеличить предел обнаружения исследуемых веществ. Теоретические и экспериментальные исследования показали, что максимум напряженности электрического поля формируется на углах или вершинах анизотропных наночастиц с максимальной кривизной [15].

Цель настоящей работы — установить влияние экстракта плодов калины красной и антибиотиков на бак-

териальные колонии методом спектроскопии комбинационного рассеяния в присутствии коллоидных и планарных структур, усиливающих сигнал комбинационного рассеяния света.

Используемые методы и подходы

Микробиологическая пробоподготовка. В работе использован штамм (*Dh5a*) *Escherichia coli* (*E. Coli*), предоставленный Балтийским федеральным университетом имени Иммануила Канта НОЦ «Прикладная биотехнология». В качестве среды для роста использовался лизогенный бульон (*Lysogeny broth*, *LB*). Штамм бактерий *E. Coli* культивирован из глицеринового стока при температуре минус 80 °С в бульоне *LB* и инкубирован в течение 12 ч при 250 об/мин и температуре $37 \pm 0,5$ °С. Полученные культуры бактерий были разбавлены бульоном *LB* для достижения оптической плотности 0,2 при 600 нм и помещены в чашки Петри на 12 ч для дальнейшего роста. Выращенные колонии бактерий были переданы для дальнейшего исследования НОЦ «Фундаментальная и прикладная фотоника. Нанопотоника».

Для приготовления экстрактов из плодов калины использованы заранее размороженные ягоды. Разморозка ягод была произведена в течении 30 мин при комнатной температуре (около 22 °С) с дальнейшим извлечением косточек и выжимкой сока. Для удаления мякоти полученный сок был центрифугирован в течении 10 мин при 10 000 об/мин и очищен фильтрованием надосадочный слой, в результате получен экстракт калины. Бактерии *E. Coli* (40 мкл) подвергали стрессу в течение 10 мин, смешивая их с приготовленным экстрактом калины (20 мкл). Далее полученная смесь была нанесена на анодированный титан [16] объемом 2,5 мкл для регистрации спектров КРС.

В экспериментах использовался антибиотик широкого спектра — цефтриаксон, рабочей концентрации 7,5 мг/мл.

Подготовка оптического сенсора. Для спектральной съемки бактерий в присутствии экстракта плодов калины использована методология, реализованная на анодированных титановых поверхностях, апробированная ранее, но без нанесенных золотых наночастиц [17]. Выбор данной поверхности для усиления сигнала КРС обусловлен наличием плазмонного резонанса, генерируемого в результате фотовозбуждений шероховатой поверхности анодированного титана. Для съемки антибиотиков была применена альтернативная, новая, менее ресурсоемкая технология, основанная на функционализации поверхности кварцевых стекол нанозвездами. Для этого применены оптически прозрачные кварцевые стекла марки КУ-1. Очистка стекол осуществлена многостадийным способом. На первом этапе пластины из стекла КУ-1 были промыты в ультразвуковой ванне в течение 30 мин, в которой через каждые 10 мин происходила замена жидкости по следующей схеме: Milli-Q — изопропиловый спирт — Milli-Q. Очищенные пластины были просушены при температуре 90 °С до полного испарения жидкости на поверхности. Высушенные стекла располагали вертикаль-

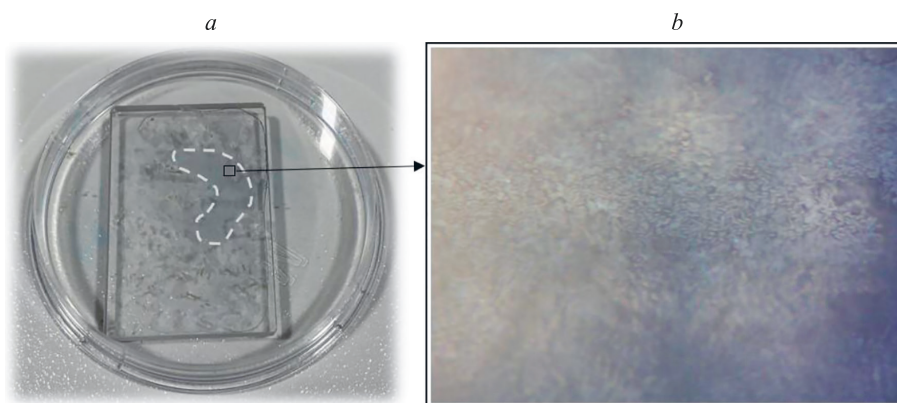


Рис. 1. Бактерии, нанесенные мазком на поверхность оптического сенсора (а), и изображение бактерий *E. Coli* на поверхности кварцевого стекла при увеличении 100× (b)

Fig. 1. Bacteria smeared on the surface of the optical sensor (a) and the image of *E. Coli* cells on the surface of the quartz glass at magnification 100× (b)

но в термостойкой посуде с раствором пираньи (30 % H_2O_2 и 96 % H_2SO_4 , 1:3) и подогреты до 70 °С. Через 30 мин пластины были промыты три раза по 10 мин в ультразвуковой ванне с Milli-Q и просушены при 90 °С до полного высыхания. Очищенные стекла располагали вертикально в 5 % растворе АPTES ((3-Аминопропил) триэтоксисилан) и безводного толуола на 24 ч. Для очистки от излишек АPTES-образцы последовательно погружали в ультразвуковую ванны с безводным этанолом (два раза по 10 мин) и с сверхчистой водой (три раза по 10 мин). На последнем этапе на АPTES-модифицированные поверхности адсорбировали золотые нанозвезды. Для этого пластины располагали горизонтально в коллоидных растворах и оставляли на 12 ч. По истечению данного временного промежутка стекла промывали водой и использовали по назначению. Оптические свойства таких сенсоров были подробно изучены в работе [18]. Бактерии были помещены на поверхность полученной структуры мазком и оказались различимы при стократном увеличении (рис. 1).

Экспериментальные условия регистрации спектров

Изучаемый образец был помещен на держатель спектрометра Virsa (Renishaw). С помощью цифровой видеокамеры получено изображение образца на оптическом столе. Выполнена юстировка спектрометра и произведено позиционирование образцов. Наблюдение изображения осуществлялось на экран компьютера с помощью программного обеспечения Wire 5.4. С помощью Wire 5.4 выполнялись: настройка параметров прибора и источника лазерного излучения; управление и получение данных с детекторов; обработка данных и съемка образцов.

Спектральная съемка на анодированном титане бактерий до воздействия антибиотика и экстракта (контрольные спектры) и после воздействия экстракта была проведена при условиях: динамическая съемка в диапазоне волновых чисел 350–3200 см^{-1} ; накопление сигнала 30 с; длина волны лазера $\lambda = 785$ нм; мощность лазера варьировалась от 30 до 60 мВт и времени нако-

пления сигнала на детекторе от 30 до 60 с. Выбранные, оптимальные условия съемки были обусловлены факторами неповреждения образца и отсутствия засветки детектора.

После регистрации спектров бактерий (контрольные спектры) с помощью автоматической пипетки Eppendorf Research на бактерии была нанесена капля выбранного антибиотика объемом 1 мкл. В течение 5 мин происходило высыхание лекарственного препарата, после чего проведена спектральная съемка с антибиотиком при условиях, отличающихся от съемки на анодированном титане диапазоном мощности лазера: от 45 до 15 мВт. Измерения колебательных спектров выполнялись каждые 5 мин с целью наблюдения за динамикой изменения бактериальной стенки под воздействием антибиотика. Съемка была прекращена, когда на протяжении трех изменений спектральная картина не изменялась.

Полученные графики были сохранены в формате .txt для дальнейшей обработки в пакете программ OriginPro.

Результаты исследования

В результате проведения экспериментальной части получены спектры КРС и ГКРС бактерий *E. Coli* до и после воздействия антибиотиков и выжимки плодов калины. Совокупность спектров, полученных при естественном высыхании бактерий, показана на рис. 2.

На рис. 2, а наблюдается постепенное увеличение интенсивности спектральных полос КРС бактерий *E. Coli* (спектры № 1–№ 3). Спектры получены при следующих условиях съемки: мощность лазера — 60 мВт; время накопления — 60 с. При регистрации спектров № 4–№ 13 экспериментальные условия были изменены (мощность лазера — 30 мВт, время накопления — 30 с) по причине резкого усиления сигнала КРС вследствие приближения (высыхания) исследуемого образца к поверхности анодированного титана. Для лучшей идентификации спектральных мод осуществлено усерднее данных по 13 спектрам (рис. 1, b). Для дальнейшего исследования антибактериального эффекта выжим-

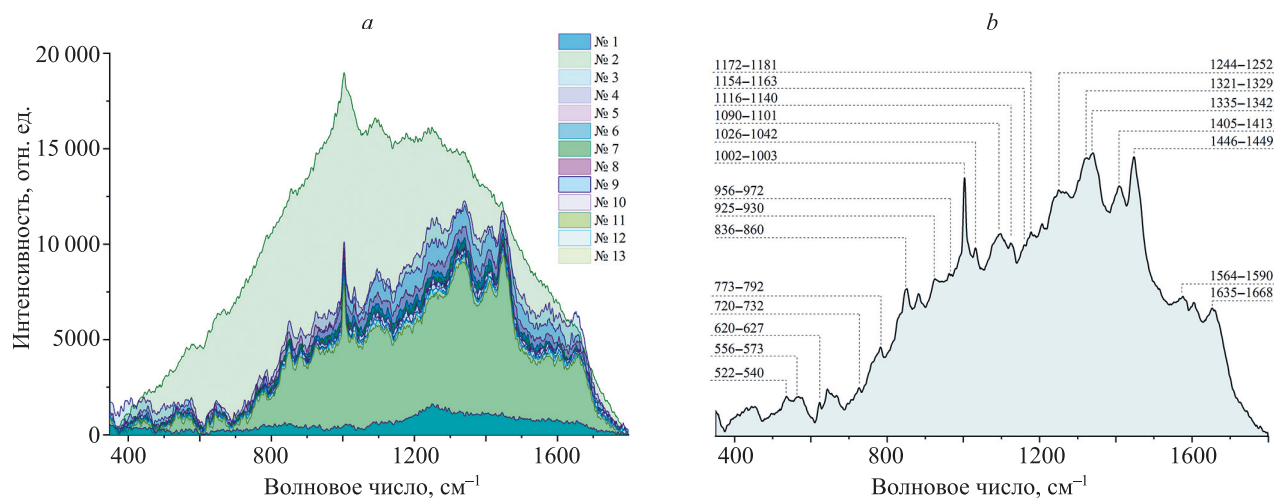


Рис. 2. Спектры комбинационного рассеяния света бактерий *E. Coli*, зарегистрированные при естественном высыхании бактерий (а), и усредненный спектр (б), являющийся их комбинацией

Fig. 2. Raman spectra of *E. Coli* recorded during natural drying of bacteria (a), and the averaged spectrum (b) which is their combination

ки плодов калины выделены спектральные полосы, в которых наблюдались аминокислоты и пуриновые производные (аденин, гуанин, гипоксантин, ксантин) [19, 20], которые представлены в таблице.

Таблица. Спектральные полосы, наблюдаемые в усредненном спектре бактерий *E. Coli* и их интерпретация

Table. Spectral bands observed in the averaged spectrum of *E. Coli* and their interpretation

Спектральные полосы, см^{-1}	Интерпретация [19, 20]
522–540	гуанин
556–573	ксантин, гуанин, аденин
620–627	гипоксантин, аденин, гуанин
720–732	аденин, гипоксантин
773–792	гипоксантин
836–860	тирозин
925–930	гипоксантин
956–972	ксантин, гуанин, гипоксантин, аденин
1002–1003	фенилаланин, белок
1026–1042	гуанин, аденин, гипоксантин
1090–1101	гипоксантин
1116–1140	ксантин, гуанин, аденин
1154–1163	гипоксантин
1172–1181	гуанин, аденин
1244–1252	гипоксантин
1321–1329	гипоксантин
1335–1342	аденин
1405–1413	лейцин
1446–1449	гипоксантин, гуанин, аденин
1564–1590	гуанин, аденин, ксантин, гипоксантин
1635–1668	гуанин, аденин, ксантин, гипоксантин

Инактивация бактериальных микроорганизмов является нетривиальной задачей. В зависимости от способа (ультрафиолетовое облучение, спирты, температура, антибиотики [19, 21–23], и т. д.) и времени воздействия наблюдаются разные спектральные изменения. Изменения касаются интенсивности и положения мод, соответствующих нуклеиновым кислотам, белкам и липидам, наблюдаемым в спектрах КРС бактерий *E. Coli*. В случае исследования воздействия выжимки плодов калины на бактериальные микроорганизмы методом КРС, научных данных не представлено. Однако сравнение спектров КРС, зарегистрированных от живых и мертвых бактерий, характеризуется как общим уменьшением интенсивности спектра, так и спектральных полос.

На рис. 3 представлен спектр КРС выжимки плодов калины, усредненные спектры КРС бактерий *E. Coli* до и после воздействия экстракта. Из-за перекрытия спектральных полос характерных как для плодов калины, так и для бактерий *E. Coli*, трудно проанализировать изменения во всех модах, относящихся *E. Coli*. Однако на усредненном спектре *E. Coli* после воздействия выжимки плодов калины были определены моды (853 см^{-1} , 965 см^{-1} , 1003 см^{-1} , 1031 см^{-1} , 1410 см^{-1} , 1450 см^{-1} , 1658 см^{-1}), которые не проявляются на спектре КРС выжимки плодов калины. При сравнении мод 853 см^{-1} , 1003 см^{-1} , 1410 см^{-1} , 1450 см^{-1} , 1658 см^{-1} на спектрах *E. Coli* до и после воздействия экстракта наблюдается уменьшение интенсивности спектральных полос, относящихся к пуриновым метаболитам, аминокислотам, что предварительно указывает на инактивацию жизнедеятельности бактерий, вследствие воздействия флавоноида кверцетина.

На рис. 4 представлены экспериментальные спектры чувствительного штамма бактерий *E. Coli* (черный спектр), антибиотика (красный спектр) и спектр бактерий после взаимодействия с цефтриаксоном (синий спектр). Видно несколько характерных особенностей воздействия цефтриаксона на чувствительный штамм

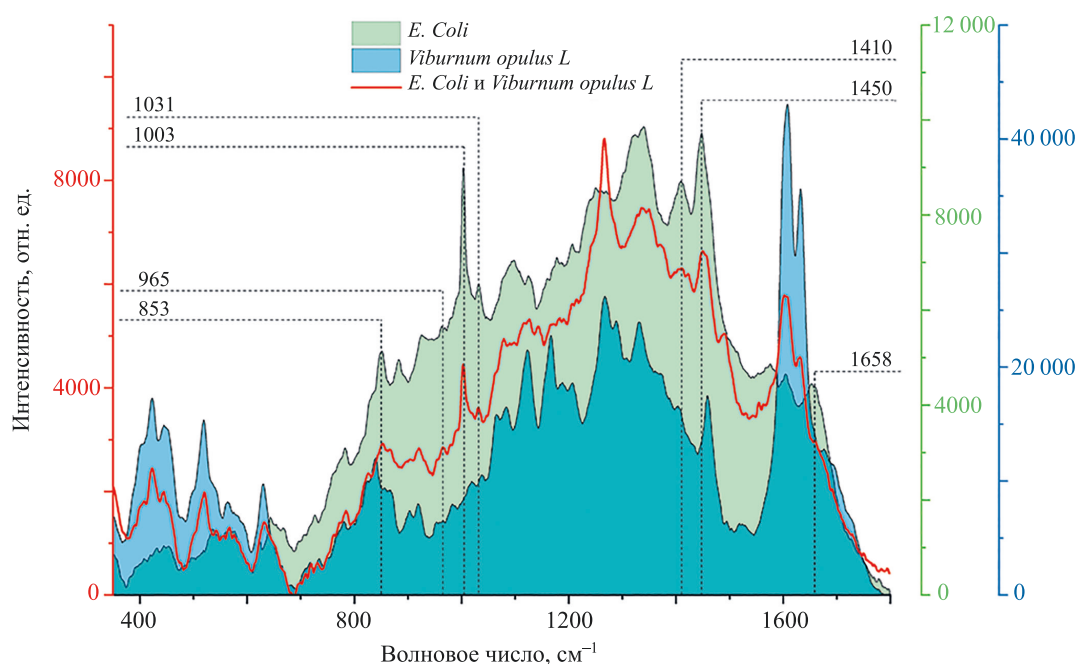


Рис. 3. Спектры комбинационного рассеяния света выжимки плодов калины и усредненные спектры *E. Coli* до и после воздействия выжимки плодов калины

Fig. 3. Raman spectrum of *Viburnum opulus L* pomace, averaged Raman spectra of *E. Coli* before and after exposure to *Viburnum opulus L* pomace

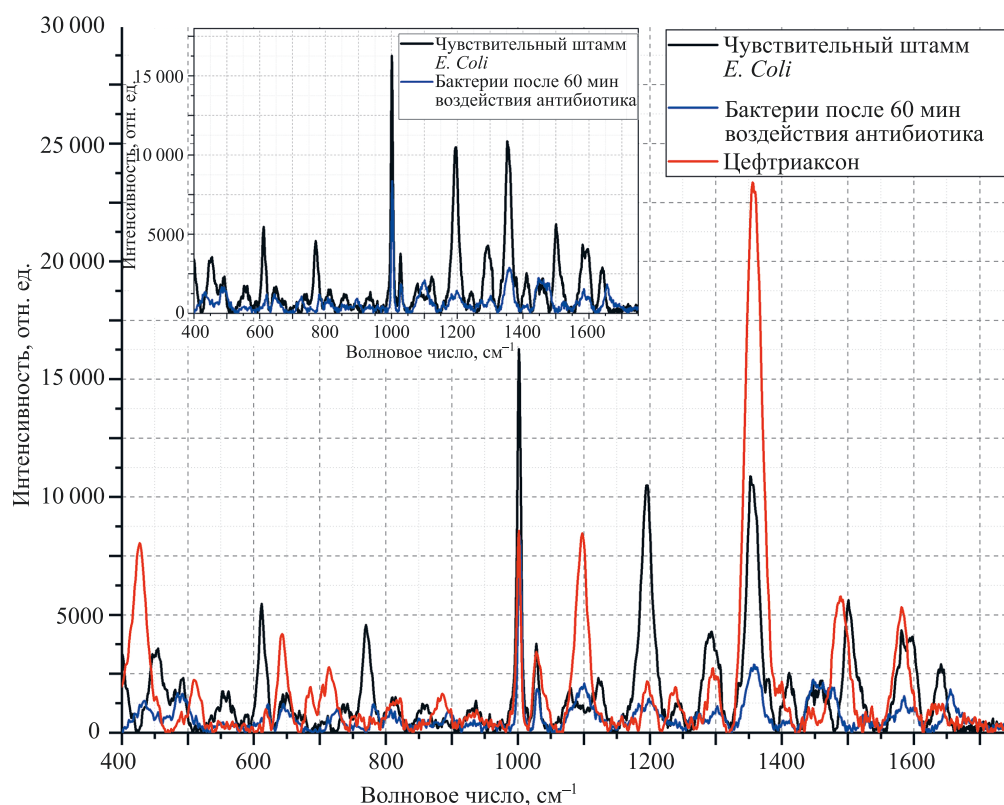


Рис. 4. Спектры гигантского комбинационного рассеяния бактерий *E. Coli* и антибиотика цефтриаксон. На вставке графика изображено сравнение спектров чувствительного штамма бактерий и штамма бактерий после 60 мин воздействия антибиотика

Fig. 4. SERS spectra of bacteria *E. Coli* and antibiotic ceftriaxone.

The inset of the graph shows a comparison of the spectra of the susceptible bacterial strain and the bacterial strain after 60 min of antibiotic exposure

E. Coli для органических соединений, формирующих бактериальную стенку. Для нуклеиновых кислот наблюдается сдвиг максимумов с 735 см^{-1} на 727 см^{-1} , с 771 см^{-1} на 785 см^{-1} , а также уменьшение интенсивности максимумов нуклеиновых кислот на 672 см^{-1} , 812 см^{-1} и 1575 см^{-1} , однако на значении 1483 см^{-1} наблюдается увеличение интенсивности. Для белковых полос заметно снижение интенсивности максимумов на значениях: 855 см^{-1} , 1003 см^{-1} , 1031 см^{-1} и 1246 см^{-1} . Для липидной полосы определено уменьшение интенсивности на 1064 см^{-1} , а также уменьшение интенсивности и сдвиг с 1295 см^{-1} на 1300 см^{-1} . Отдельного обсуждения заслуживает полоса фенилаланина на частоте обратного сдвига 1003 см^{-1} , обозначенная как биомаркер клеточной гибели. Стоит отметить, что бактерии *E. Coli* широко используются для производства L-фенилаланина и других ароматических соединений [24, 25], являясь простым и изученным организмом с преимуществами четкого генетического фона и возможностью простых генетических манипуляций, а также быстрого роста в дешевых средах. В связи с этим

можно сделать вывод о его наличии в клетке *E. Coli* и связи с жизненным циклом клетки. В связи с этим предложено использование колебания на частоте обратного сдвига 1003 см^{-1} в качестве маркера клеточной гибели.

Заключение

Проведена идентификация спектральных мод, наблюдаемых в усредненном спектре комбинационного рассеяния колоний бактерий *Escherichia coli*. Успешно выполнена идентификация спектральных мод колоний бактерий *Escherichia coli* после воздействия *Viburnum opulus L.* Показано уменьшение интенсивности спектральных полос, относящиеся к пуриновым метаболитам, аминокислотам, что указывает на инактивацию жизнедеятельности бактерий и свидетельствует об эффективной антибактериальной активности *Viburnum opulus L.* По результатам исследования установлено, что маркером клеточной гибели может являться полоса фенилаланина на частоте обратного сдвига 1003 см^{-1} .

Литература

- Coates A.R.M., Halls G., Hu Y. Novel classes of antibiotics or more of the same? // *British Journal of Pharmacology*. 2011. V. 163. N 1. P. 184–194. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01250.x>
- Cheesman M.J., Ilanko A., Blonk B. Developing new antimicrobial therapies: are synergistic combinations of plant extracts/compounds with conventional antibiotics the solution? // *Pharmacognosy Reviews*. 2017. V. 11. N 22. P. 57. https://doi.org/10.4103/phrev.phrev_21_17
- Aminov R.I. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature // *Environmental Microbiology*. 2009. V. 11. N 12. P. 2970–2988. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01972.x>
- Njimoh D.L., Assob J.C.N., Mokake S.E., Nyhalah D.J., Yinda C.K., Sandjon B. Antimicrobial activities of a plethora of medicinal plant extracts and hydrolates against human pathogens and their potential to reverse antibiotic resistance // *International Journal of Microbiology*. 2015. V. 2015. P. 1–5. <https://doi.org/10.1155/2015/547156>
- Kothari V., Gupta A., Naraniwal M. Comparative study of various methods for extraction of antioxidant and antibacterial compounds from plant seeds // *Journal of Natural Remedies*. 2012. V. 12. N 2. P. 162–173. <https://doi.org/10.18311/jnr/2012/271>
- Chiode M.M.M., Colonello G.P., Kabadayan F., de Souza Silva J., Suffredini I.B., Saraceni C.H.C. Plant extract incorporated into glass ionomer cement as a photosensitizing agent for antimicrobial photodynamic therapy on Streptococcus mutans // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2022. V. 38. P. 102788. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.102788>
- Sarker M.A.R., Ahn Y.H. Green phytoextracts as natural photosensitizers in LED-based photodynamic disinfection of multidrug-resistant bacteria in wastewater effluent // *Chemosphere*. 2022. V. 297. P. 134157. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134157>
- Ozkan G., Kostka T., Dräger G., Capanoglu E., Esatbeyoglu T. Bioaccessibility and transepithelial transportation of cranberrybush (*Viburnum opulus*) phenolics: Effects of non-thermal processing and food matrix // *Food Chemistry*. 2022. V. 380. P. 132036. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.132036>
- Kajszczak D., Zakłós-Szyda M., Podśędek A. *Viburnum opulus L.* A review of phytochemistry and biological effects // *Nutrients*. 2020. V. 12. N 11. P. 3398. <https://doi.org/10.3390/nu12113398>
- Perova I.B., Zhogova A.A., Cherkashin A.V., Èller K.I., Ramenskaya G.V., Samylina I.A. Biologically active substances from European guelder berry fruits // *Pharmaceutical Chemistry Journal*.

References

- Coates A.R.M., Halls G., Hu Y. Novel classes of antibiotics or more of the same? *British Journal of Pharmacology*, 2011, vol. 163, no. 1, pp. 184–194. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01250.x>
- Cheesman M.J., Ilanko A., Blonk B. Developing new antimicrobial therapies: are synergistic combinations of plant extracts/compounds with conventional antibiotics the solution? *Pharmacognosy Reviews*, 2017, vol. 11, no. 22, pp. 57. https://doi.org/10.4103/phrev.phrev_21_17
- Aminov R.I. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environmental Microbiology*, 2009, vol. 11, no. 12, pp. 2970–2988. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01972.x>
- Njimoh D.L., Assob J.C.N., Mokake S.E., Nyhalah D.J., Yinda C.K., Sandjon B. Antimicrobial activities of a plethora of medicinal plant extracts and hydrolates against human pathogens and their potential to reverse antibiotic resistance. *International Journal of Microbiology*, 2015, vol. 2015, pp. 1–5. <https://doi.org/10.1155/2015/547156>
- Kothari V., Gupta A., Naraniwal M. Comparative study of various methods for extraction of antioxidant and antibacterial compounds from plant seeds. *Journal of Natural Remedies*, 2012, vol. 12, no. 2, pp. 162–173. <https://doi.org/10.18311/jnr/2012/271>
- Chiode M.M.M., Colonello G.P., Kabadayan F., de Souza Silva J., Suffredini I.B., Saraceni C.H.C. Plant extract incorporated into glass ionomer cement as a photosensitizing agent for antimicrobial photodynamic therapy on Streptococcus mutans. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2022, vol. 38, pp. 102788. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.102788>
- Sarker M.A.R., Ahn Y.H. Green phytoextracts as natural photosensitizers in LED-based photodynamic disinfection of multidrug-resistant bacteria in wastewater effluent. *Chemosphere*, 2022, vol. 297, pp. 134157. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134157>
- Ozkan G., Kostka T., Dräger G., Capanoglu E., Esatbeyoglu T. Bioaccessibility and transepithelial transportation of cranberrybush (*Viburnum opulus*) phenolics: Effects of non-thermal processing and food matrix. *Food Chemistry*, 2022, vol. 380, pp. 132036. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.132036>
- Kajszczak D., Zakłós-Szyda M., Podśędek A. *Viburnum opulus L.* A review of phytochemistry and biological effects. *Nutrients*, 2020, vol. 12, no. 11, pp. 3398. <https://doi.org/10.3390/nu12113398>
- Perova I.B., Zhogova A.A., Cherkashin A.V., Èller K.I., Ramenskaya G.V., Samylina I.A. Biologically active substances from European guelder berry fruits. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2014, vol. 48, no. 5, pp. 332–339. <https://doi.org/10.1007/s11094-014-1105-8>

2014. V. 48. N 5. P. 332–339. <https://doi.org/10.1007/s11094-014-1105-8>
11. Balouiri M., Sadiki M., Ibensouda S.K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review // *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2016. V. 6. N 2. P. 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jppha.2015.11.005>
12. Jung G.B., Nam S.W., Choi S., Lee G.-J., Park H.-K. Evaluation of antibiotic effects on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm using Raman spectroscopy and multivariate analysis // *Biomedical Optics Express*. 2014. V. 5. N 9. P. 3238–3251. <https://doi.org/10.1364/boe.5.003238>
13. Macias G., Alba M., Marsal L.F., Mihi A. Surface roughness boosts the SERS performance of imprinted plasmonic architectures // *Journal of Materials Chemistry C*. 2016. V. 4. N 18. P. 3970–3975. <https://doi.org/10.1039/c5tc02779a>
14. Barbillon G. Latest novelties on plasmonic and non-plasmonic nanomaterials for SERS sensing // *Nanomaterials*. 2020. V. 10. N 6. P. 1200. <https://doi.org/10.3390/nano10061200>
15. Khoury C.G., Vo-Dinh T. Gold nanostars for surface-enhanced Raman scattering: synthesis, characterization and optimization // *The Journal of Physical Chemistry C*. 2008. V. 112. N 48. P. 18849–18859. <https://doi.org/10.1021/jp8054747>
16. Tcibulnikova A.V., Khankaev A.A., Samusev I.G., Slezhkin V.A., Bryukhanov V.V., Demin M.V., Myslitskaya N.A., Lyatun I.I., Medvedskaya P.N. Polarized plasmon resonance spectra of electrochemically modified titanium surfaces with gold nanoparticles // *Materials Research Express*. 2020. V. 7. N 12. P. 125802. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/abce9e>
17. Zyubin A., Rafalskiy V., Tcibulnikova A., Moiseeva E., Matveeva K., Tsapkova A., Lyatun I., Medvedskaya P., Samusev I., Demin M. Surface-enhanced Raman spectroscopy for antiplatelet therapy effectiveness assessment // *Laser Physics Letters*. 2020. V. 17. N 4. P. 045601. <https://doi.org/10.1088/1612-202x/ab7be5>
18. Зюбин А.Ю., Кон И.И., Кундалевич А.А., Демишкевич Е.А., Матвеева К.И., Зозуля А.С., Евтифеев Д.О., Полторабатыко Д.А., Самусев И.Г. Оптические свойства планарных плазмон-активных поверхностей, модифицированных золотыми нанозвездами // Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики. 2022. Т. 22. № 5. С. 824–831. <https://doi.org/10.17586/2226-1494-2022-22-5-824-831>
19. Durovich E., Evtushenko E., Senko O., Stepanov N., Efremenko E., Eremenko A., Kurochkin I. Molecular origin of surface-enhanced Raman spectra of *E. coli* suspensions excited at 532 and 785 nm using silver nanoparticle sols as sers substrates // *Bulletin of Russian State Medical University*. 2018. N 6. P. 25–32. <https://doi.org/10.24075/brsmu.2018.088>
20. Noothalapati Venkata H.N. Raman Micro-spectroscopic and Imaging Studies of *Escherichia coli* Biofilm in situ and Intracellular Dynamics of Fission Yeasts in vivo Using Stable Isotope Labelling: PhD Thesis / National Chiao Tung University, Department of Applied Chemistry, 2013. 68 p.
21. Teng L., Wang X., Wang X., Gou H., Ren L., Wang T., Wang Y., Ji Y., Huang W.E., Xu J. Label-free, rapid and quantitative phenotyping of stress response in *E. coli* via ramanome // *Scientific Reports*. 2016. V. 6. N 1. P. 34359. <https://doi.org/10.1038/srep34359>
22. Moritz T.J., Polage C.R., Taylor D.S., Krol D.M., Lane S.M., Chan J.W. Evaluation of *Escherichia coli* cell response to antibiotic treatment by use of Raman spectroscopy with laser tweezers // *Journal of Clinical Microbiology*. 2010. V. 48. N 11. P. 4287–4290. <https://doi.org/10.1128/jcm.01565-10>
23. Li R., Dhankhar D., Chen J., Krishnamoorthi A., Cesario Th.C., Rentzepis P.M. Identification of live and dead bacteria: A Raman spectroscopic study // *IEEE Access*. 2019. V. 7. P. 23549–23559. <https://doi.org/10.1109/access.2019.2899006>
24. Gu P., Yang F., Kang J., Wang Q., Qi Q. One-step of tryptophan attenuator inactivation and promoter swapping to improve the production of L-tryptophan in *Escherichia coli* // *Microbial Cell Factories*. 2012. V. 11. N 1. P. 1–9. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-30>
25. Gu P., Su T., Wang Q., Liang Q., Qi Q. Tunable switch mediated shikimate biosynthesis in an engineered non-auxotrophic *Escherichia coli* // *Scientific Reports*. 2016. V. 6. N 1. P. 29745. <https://doi.org/10.1038/srep29745>
11. Balouiri M., Sadiki M., Ibensouda S.K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2016, vol. 6, no. 2, pp. 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jppha.2015.11.005>
12. Jung G.B., Nam S.W., Choi S., Lee G.-J., Park H.-K. Evaluation of antibiotic effects on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm using Raman spectroscopy and multivariate analysis. *Biomedical Optics Express*, 2014, vol. 5, no. 9, pp. 3238–3251. <https://doi.org/10.1364/boe.5.003238>
13. Macias G., Alba M., Marsal L.F., Mihi A. Surface roughness boosts the SERS performance of imprinted plasmonic architectures. *Journal of Materials Chemistry C*, 2016, vol. 4, no. 18, pp. 3970–3975. <https://doi.org/10.1039/c5tc02779a>
14. Barbillon G. Latest novelties on plasmonic and non-plasmonic nanomaterials for SERS sensing. *Nanomaterials*, 2020, vol. 10, no. 6, pp. 1200. <https://doi.org/10.3390/nano10061200>
15. Khoury C.G., Vo-Dinh T. Gold nanostars for surface-enhanced Raman scattering: synthesis, characterization and optimization. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2008, vol. 112, no. 48, pp. 18849–18859. <https://doi.org/10.1021/jp8054747>
16. Tcibulnikova A.V., Khankaev A.A., Samusev I.G., Slezhkin V.A., Bryukhanov V.V., Demin M.V., Myslitskaya N.A., Lyatun I.I., Medvedskaya P.N. Polarized plasmon resonance spectra of electrochemically modified titanium surfaces with gold nanoparticles. *Materials Research Express*, 2020, vol. 7, no. 12, pp. 125802. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/abce9e>
17. Zyubin A., Rafalskiy V., Tcibulnikova A., Moiseeva E., Matveeva K., Tsapkova A., Lyatun I., Medvedskaya P., Samusev I., Demin M. Surface-enhanced Raman spectroscopy for antiplatelet therapy effectiveness assessment. *Laser Physics Letters*, 2020, vol. 17, no. 4, pp. 045601. <https://doi.org/10.1088/1612-202x/ab7be5>
18. Zyubin A.Yu., Kon I.I., Kundalevich A.A., Demishkevich E.A., Matveeva K.I., Zozulya A.S., Evtifeev D.O., Poltorabatyko D.A., Samusev I.G. Optical properties of planar plasmon active surfaces modified with gold nanostars. *Scientific and Technical Journal of Information Technologies, Mechanics and Optics*, 2022, vol. 22, no. 5, pp. 824–831. (in Russian). <https://doi.org/10.17586/2226-1494-2022-22-5-824-831>
19. Durovich E., Evtushenko E., Senko O., Stepanov N., Efremenko E., Eremenko A., Kurochkin I. Molecular origin of surface-enhanced Raman spectra of *E. coli* suspensions excited at 532 and 785 nm using silver nanoparticle sols as sers substrates. *Bulletin of Russian State Medical University*, 2018, no. 6, pp. 25–32. <https://doi.org/10.24075/brsmu.2018.088>
20. Noothalapati Venkata H.N. *Raman Micro-spectroscopic and Imaging Studies of Escherichia coli Biofilm in situ and Intracellular Dynamics of Fission Yeasts in vivo Using Stable Isotope Labelling*. PhD Thesis. National Chiao Tung University, Department of Applied Chemistry, 2013, 68 p.
21. Teng L., Wang X., Wang X., Gou H., Ren L., Wang T., Wang Y., Ji Y., Huang W.E., Xu J. Label-free, rapid and quantitative phenotyping of stress response in *E. coli* via ramanome. *Scientific Reports*, 2016, vol. 6, no. 1, pp. 34359. <https://doi.org/10.1038/srep34359>
22. Moritz T.J., Polage C.R., Taylor D.S., Krol D.M., Lane S.M., Chan J.W. Evaluation of *Escherichia coli* cell response to antibiotic treatment by use of Raman spectroscopy with laser tweezers. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010, vol. 48, no. 11, pp. 4287–4290. <https://doi.org/10.1128/jcm.01565-10>
23. Li R., Dhankhar D., Chen J., Krishnamoorthi A., Cesario Th.C., Rentzepis P.M. Identification of live and dead bacteria: A Raman spectroscopic study. *IEEE Access*, 2019, vol. 7, pp. 23549–23559. <https://doi.org/10.1109/access.2019.2899006>
24. Gu P., Yang F., Kang J., Wang Q., Qi Q. One-step of tryptophan attenuator inactivation and promoter swapping to improve the production of L-tryptophan in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 2012, vol. 11, no. 1, pp. 1–9. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-30>
25. Gu P., Su T., Wang Q., Liang Q., Qi Q. Tunable switch mediated shikimate biosynthesis in an engineered non-auxotrophic *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, 2016, vol. 6, no. 1, pp. 29745. <https://doi.org/10.1038/srep29745>

Авторы

Матвеева Карина Игоревна — кандидат физико-математических наук, научный сотрудник, Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта, Калининград, 236041, Российская Федерация, [sc 57200305996](https://orcid.org/0000-0003-2585-163X), <https://orcid.org/0000-0003-2585-163X>, matveeva.k.i@inbox.ru

Кундалевич Анна Анатольевна — инженер-исследователь, Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта, Калининград, 236041, Российская Федерация, [sc 57219604837](https://orcid.org/0000-0001-7428-6441), <https://orcid.org/0000-0001-7428-6441>, Kundalevich3@mail.ru

Капитунова Анастасия Ивановна — инженер-исследователь, Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта, Калининград, 236041, Российская Федерация, [sc 57952671000](https://orcid.org/0000-0003-0958-6338), <https://orcid.org/0000-0003-0958-6338>, AIKapitunova@mail.ru

Зозуля Александр Сергеевич — техник, Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта, Калининград, 236041, Российская Федерация, [sc 57952671000](https://orcid.org/0000-0001-5717-8625), <https://orcid.org/0000-0001-5717-8625>, Zozul97@mail.ru

Сухих Станислав Алексеевич — доктор технических наук, доцент, заведующий лабораторией, Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта, Калининград, 236041, Российская Федерация, [sc 57200609482](https://orcid.org/0000-0001-7910-8388), <https://orcid.org/0000-0001-7910-8388>, SSukhikh@kantiana.ru

Цибульникова Анна Владимировна — кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник, Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта, Калининград, 236041, Российская Федерация, [sc 57193169565](https://orcid.org/0000-0001-8578-0701), <https://orcid.org/0000-0001-8578-0701>, memorgold@mail.ru

Зюбин Андрей Юрьевич — кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник, Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта, Калининград, 236041, Российская Федерация, [sc 57193159520](https://orcid.org/0000-0002-9766-1408), <https://orcid.org/0000-0002-9766-1408>, azubin@mail.ru

Самусев Илья Геннадьевич — кандидат физико-математических наук, директор Научно-образовательного центра «Фундаментальная и прикладная фотоника. Нанопотоника», Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта, Калининград, 236041, Российская Федерация, [sc 12779220200](https://orcid.org/0000-0001-5026-7510), <https://orcid.org/0000-0001-5026-7510>, ISamusev@kantiana.ru

Authors

Karina I. Matveeva — PhD (Physics & Mathematics), Researcher, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, 236041, Russian Federation, [sc 57200305996](https://orcid.org/0000-0003-2585-163X), <https://orcid.org/0000-0003-2585-163X>, matveeva.k.i@inbox.ru

Anna A. Kundalevich — Research Engineer, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, 236041, Russian Federation, [sc 57219604837](https://orcid.org/0000-0001-7428-6441), <https://orcid.org/0000-0001-7428-6441>, Kundalevich3@mail.ru

Anastasia I. Kapitunova — Research Engineer, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, 236041, Russian Federation, [sc 57219899495](https://orcid.org/0000-0003-0958-6338), <https://orcid.org/0000-0003-0958-6338>, AIKapitunova@mail.ru

Aleksandr S. Zozulya — Technician, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, 236041, Russian Federation, [sc 57952671000](https://orcid.org/0000-0001-5717-8625), <https://orcid.org/0000-0001-5717-8625>, Zozul97@mail.ru

Stanislav A. Sukhikh — D.Sc., Associate Professor, Head of Laboratory, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, 236041, Russian Federation, [sc 57200609482](https://orcid.org/0000-0001-7910-8388), <https://orcid.org/0000-0001-7910-8388>, SSukhikh@kantiana.ru

Anna V. Tsubulnikova — PhD (Physics & Mathematics), Senior Researcher, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, 236041, Russian Federation, [sc 57193169565](https://orcid.org/0000-0001-8578-0701), <https://orcid.org/0000-0001-8578-0701>, memorgold@mail.ru

Andrey Yu. Zyubin — PhD (Physics & Mathematics), Senior Researcher, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, 236041, Russian Federation, [sc 57193159520](https://orcid.org/0000-0002-9766-1408), <https://orcid.org/0000-0002-9766-1408>, azubin@mail.ru

Ilya G. Samusev — PhD (Physics & Mathematics), Head of the Research & Education Center “Fundamental and Applied Photonics & Nanophotonics”, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, 236041, Russian Federation, [sc 12779220200](https://orcid.org/0000-0001-5026-7510), <https://orcid.org/0000-0001-5026-7510>, ISamusev@kantiana.ru

Статья поступила в редакцию 12.05.2023

Одобрена после рецензирования 08.06.2023

Принята к печати 18.07.2023

Received 12.05.2023

Approved after reviewing 08.06.2023

Accepted 18.07.2023



Работа доступна по лицензии
Creative Commons
«Attribution-NonCommercial»