УДК 579:53.086

АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ КАК МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ В МИКРОБИОЛОГИИ

Потатуркина-Нестерова Н.И., Немова И.С., Даньшина А.В.

Ульяновский государственный университет, Ульяновск, Россия (432970, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42), potaturkinani@mail.ru

В статье рассматривается вопрос о значении атомно-силовой микроскопии в микробиологии. Данный вид микроскопии является перспективным методом, позволяющим исследовать особенности структуры поверхности бактерий и вирусов различных таксономических групп при решении фундаментальных и практических задач биологии и медицины. Атомно-силовая микроскопия может быть использована для исследования морфологических изменений живых бактерий под действием антибиотиков. Основными преимуществами метода атомно-силовой микроскопии, используемого для изучения тонких структур бактериальных клеток, по сравнению с традиционными способами являются возможность изучения реальной поверхности клетки без применения специальных методов подготовки образцов, высокое пространственное разрешение.

Ключевые слова: нанотехнологии, атомно-силовая микроскопия, микробиология, идентификация микроорганизмов.

ATOMIS FORCE MICROSCOPY AS A RESEARCH METHOD IN MICROBIOLOGY

Potaturkina-Nesterova N.I., Nemova I.S., Danshina A.V.

Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russia (432970, Ulyanovsk, Leo Tolstoy St., 42), potaturkinani@mail.ru

This article deals with a value of atomic force microscopy in microbiology. This kind of microscopy is a perspective method, which allows researching the surface structure features of bacteria and viruses in different taxonomic groups by fundamental and practical problems' decision in biology and medicine. Atomic force microscopy can be used for research of morphological changes in living bacteria under antibiotic effect. In comparison to traditional methods the main advantages of the atomic-force microscopy's method, which is used for studying of bacterial cells' fine structures, are an opportunity for studying of the cell's real surface without application of special preparing methods and a high spatial resolution.

Key words: nanotechnologies, atomic force microscopy, microbiology, microorganisms' identification.

Разработка новых методов анализа в микробиологии имеет большое значение для развития науки и применения ее результатов в различных отраслях народного хозяйства. Одним из наиболее востребованных направлений в микробиологии является разработка быстрых и чувствительных методов изучения и идентификации бактерий на основе бионанотехнологий [3; 10]. Бионатехнологии открывают новые перспективы для значительного увеличения чувствительности анализа и идентификации микроорганизмов. Результаты работы очень важны для микробиологии, поскольку существенно расширяют и дополняют представления о методах идентификации прокариот и вносят существенный вклад в понимание процессов анализа бактериального мира [2; 5; 6; 9].

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) является одним из методов бионанотехнологии – современной биологической науки, оперирующей наноразмерными

объектами. Атомно-силовая микроскопия принадлежит к семейству проксимальной зондовой микроскопии для анализа поверхности и ее свойств на атомно-молекулярном уровне. На расстоянии около одного ангстрема между атомами образца и атомом зонда (кантилевера) возникают силы отталкивания, а на больших расстояниях – силы притяжения. Идея устройства очень проста: кантилевер, перемещаясь относительно поверхности и реагируя на силовое взаимодействие, регистрирует ее рельеф. На основании прибора укреплен цилиндр, в котором находится сканер – пьезоэлектрическая керамика, изменяющая свои размеры при приложении электрического поля. В верхней части цилиндра крепится исследуемый образец, который сканер может перемещать в трех взаимно перпендикулярных направлениях. В горизонтальной плоскости образец сканируется по строкам: пройдя одну, он смещается на следующую строчку. Обычно таких строк 512, время движения вдоль строки может варьироваться примерно от 1 до 0,02 с, а длину строки в самом распространенном сканере можно выбрать от ~10 нм до ~10 мкм [1]. В зависимости от типа взаимодействия АСМ может работать в одном из нескольких режимов.

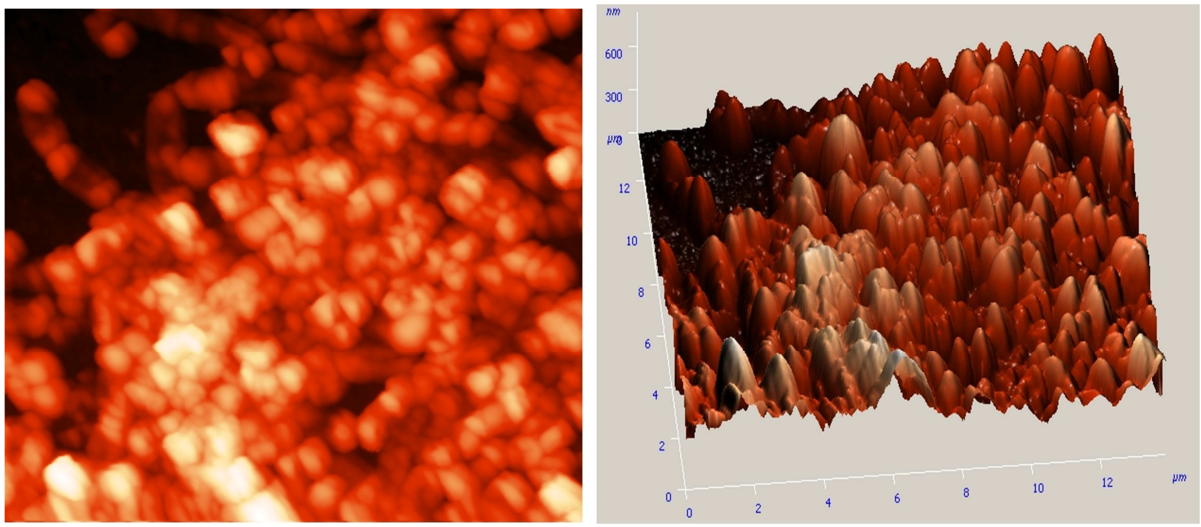
В контактном режиме (соответствует области отталкивания на графике межатомных сил) зонд прижимается к образцу, и его отклонение вызывается взаимным отталкиванием атомов острия иглы и поверхности в результате перекрывания их электронных оболочек и кулоновского отталкивания ядер. *В бесконтактном режиме* (соответствует области притяжения на графике межатомных сил) АСМ отслеживает притягивающие ван-дер-ваальсовые силы между острием сканирующей иглы и образцом. Зазор между острием и образцом обычно составляет 5–10 нм.

Изобретение атомно-силовой микроскопии предоставило уникальную возможность исследовать биологические объекты, не используя сложных методов фиксации, при этом применение можно разделить на несколько направлений: визуализация с высоким разрешением, оценка локальных механических свойств исследуемого объекта и диагностика [2; 4].

Атомно-силовая микроскопия является перспективным методом, позволяющим исследовать особенности структуры поверхности бактерий различных таксономических групп при решении фундаментальных и практических задач биологии и медицины [3; 5]. Решаются проблемы изучения клеточных структур, мембран, протеинов, вирусов, бактерий, тканей, наночастиц и их взаимодействия с другими объектами. Изучение подобных объектов методами АСМ представляет собой сложную задачу, прежде всего потому, что зонд находится в контакте с поверхностью и относительно большая сила взаимодействия может привести к необратимой деформации объекта исследования и

зонда. АСМ дает изображения бактериальных клеток и их поверхности с высоким разрешением. Эти изображения используются для анализа внешнего вида и свойств поверхности бактерий. АСМ может быть использована для изучения физиологических процессов, таких как клеточный рост и прорастание спор, а также для исследования морфологических изменений живых бактерий под действием антибиотиков.

АСМ обеспечивает получение 3D-изображений поверхностных ультраструктур с молекулярным разрешением в режиме реального времени и физиологических условиях [7]. Понимание процессов адгезии и агрегации бактериальных клеток требует не только знания физико-химических свойств (гидрофобности и электрических свойств) и химического состава, но также наномеханических свойств и ультраструктуры их поверхности. Уникальная возможность АСМ представлять бактериальный мир в субнанометровом диапазоне и в водном растворе может быть использована для исследования как самих клеток, так и их поверхности в физиологических условиях.



а б

Рис. 1. ***Staphylococcus spp.:*** а – сканирующая электронная микроскопия; б – пространственное АСМ-изображение стафилококков при площади сканирования 12×12 мкм^2.

При измерении упругих свойств бактериальной стенки можно получать информацию о внутреннем строении клетки. С помощью атомно-силовой микроскопии зарегистрировано изменение структуры липополисахаридов клеточной стенки бактерий *Escherichia coli*, наследующих генетическую детерминанту, которая контролирует синтез первичных боковых цепей дизентерийных бактерий [8]. Такие бактерии могут быть использованы в качестве штаммов-носителей при изготовлении живых векторных вакцин.

Определение шероховатости при помощи метода атомно-силовой микроскопии широко используется для оценки состояния различных объектов, однако существует лишь

небольшое число работ, где он использовался для анализа поверхности клеток. В то же время использование интегрального параметра удобно при оценке действия на клетку различных физиологически и экзогенных факторов.

Для визуализации поверхности микробных клеток методами атомно-силовой микроскопии не требуются специальные подготовительные операции, обязательные для различных видов электронной микроскопии.

Процедура подготовки образцов для атомно-силовой микроскопии заключается в их иммобилизации на ровной подложке. Материал подложки можно варьировать в широких пределах в зависимости от поставленных задач. Традиционно в качестве субстрата используются атомно-гладкие подложки из слюды, графита и других слоистых материалов, а также различные стёкла, полимерные материалы и металлические поверхности. Варьируя подложки, можно изучать адгезивные свойства бактерий на поверхности различных материалов (рис. 2).

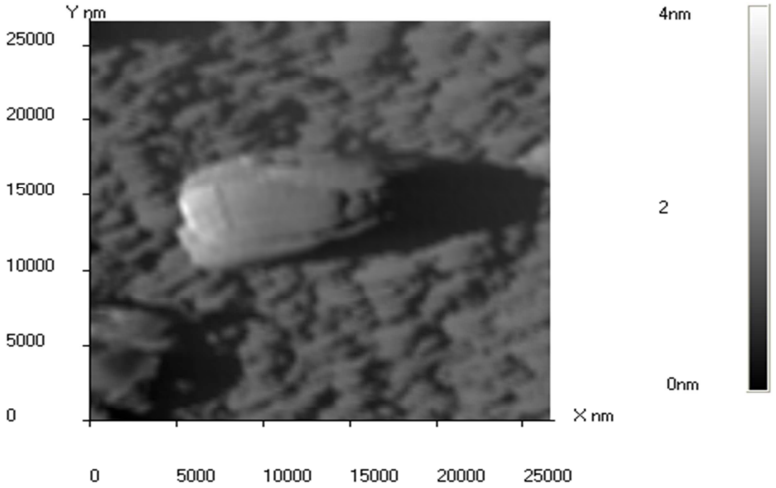


Рис. 2. *Blastocystis hominis* сканирующая электронная микроскопия.

Слюда является незаменимым материалом при приготовлении образцов для атомно-силовой микроскопии (АСМ). Она имеет атомарно гладкую поверхность, получаемую путем простого скалывания, эта поверхность является гидрофильной и при помещении в воду несет отрицательный заряд. Такая поверхность является хорошей подложкой для наблюдения разнообразных объектов, в том числе биологических (биомакромолекул, вирусов, клеток).

Возможность сканирования в жидкости еще одно достоинство АСМ [10]. Работа в жидкости на АСМ открывает новые перспективы для изучения бактериальных клеток: влияние различных антибиотиков, лекарств и других медицинских препаратов на клетки в настоящем времени с помощью АСМ. Применение жидкостной атомно-силовой

микроскопии позволяет локально проводить электрохимические реакции, прикладывая потенциал между зондом и проводящей поверхностью, что используется для исследования биологических объектов. Таким образом, было проведено исследование влияния лизоцима на *E.coli* [8].

Выбор методики измерения, анализ режимов работы, настройка параметров сканирования – это и многое другое существенно влияет на истинность полученных результатов, пространственное разрешение и сохранность объекта исследования.

Таким образом, атомно-силовая микроскопия – это развивающийся метод изображения биологических объектов, который позволяет анализировать их структуру на атомном уровне. Основными преимуществами метода атомно-силовой микроскопии, используемого для изучения тонких структур бактериальных клеток, по сравнению с традиционными способами – растровой и просвечивающей электронной микроскопии – являются:

1) возможность изучения реальной поверхности клетки без применения специальных методов подготовки образцов (напыления металлами, приготовления реплик и пр.);

2) возможность проведения исследований живых бактерий на воздухе или в различных жидких средах;

3) высокое пространственное разрешение (доли нанометра в плоскости образца и сотые доли нанометра по нормали к образцу);

4) одновременное исследование с субнанометровым пространственным разрешением локальных свойств клеточной стенки, в том числе жесткости, пластичности и адгезивности.

Список литературы

1. Бахтизин Р.З. Сканирующая туннельная микроскопия – новый метод изучения поверхности твердых тел // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – № 11. – С. 83–89.

2. Быков И.В. Развитие и автоматизация методов измерения рельефа и локальных свойств биологических объектов в атомно-силовой микроскопии : автореф. дис. … канд. ф.-м. н. – М., 2010. – 21 с.

3. Игнатов С.Г. и др. Применение АСМ для специфической визуализации микроорганизмов // Мат. VI Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием «Молекулярная диагностика – 2007». – 2007. – Т. 1. – С. 81-82.

4. Игнатов С.Г. и др. Оценка бактерицидной активности многофункциональных биоактивных наноструктурных покрытий, работающих под нагрузкой // Сб. тез. междунар. конф. «Токсикологические и нормативные аспекты производства и применения наноматериалов в России». – М., 2009. – С. 74.

5. Игнатов С.Г. и др. Атомно-силовая микроскопия как инструмент в микробиологии // Мат. V междунар. конф. «Современные достижения бионаноскопии». – М. – С. 26.

6. Поляков В.В., Смирнов В.А., Рубашкина М.В. Исследование параметров биологических объектов бесконтактным методом атомно-силовой микроскопии в жидкости // Тр. Междунар. науч.-техн. конф. и молодежной школы-семинара «Нанотехнологии – 2010». – 2010. – Ч. 2. – С. 251–253.

7. Роскошная А.С. [и др.] Применение атомно-силовой микроскопии для визуализации внутренней структуры клеток // Мат. V междунар. конф. «Современные достижения бионаноскопии». – М. – С. 41.

8. Яминский И.В., Демин В.В., Бондаренко В.М. Различия в клеточной поверхности гибридных бактерий *Escherichia coli* K12, наследующих rfb-a3,4 ген *Shigella flexneri*, выявляемые с помощью атомно-силовой микроскопии // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1997. – № 6. – С. 15–18.

9. Maluchenko N.V., Agapov I.I., Tonevitsky A.G. et al. Detection of immune complexes using atomic force microscopy // Biofizika. – 2004. – V. 49. – № 6. – P. 1008–1014.

10. Morita S. et al. Noncontact Atomic Force Microscopy and its related topics // Springer Handbook of Nanotechnology, Springer Berlin. – 2004. – 13. – P. 141–178.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки РФ в рамках ГК 16.512.11.2226 от 12.07.2011 г.

Рецензенты

Ильина Л.В., д.б.н., профессор кафедры зоологии, проректор по научной работе ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова», г. Ульяновск.

Слесарев С.М., д.б.н., профессор кафедры биологии и биоэкологии ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск.