

ИССЛЕДОВАНИЕ ПАРАМЕТРОВ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Поляков В.В., Рубашкина М.В., Смирнов В.А., Полякова В.В.

*Технологический институт Южного федерального университета в г. Таганроге,
г. Таганрог, Россия, e-mail: polyakov@fep.tti.sfedu.ru*

В данной работе представлены результаты исследования живых микроорганизмов (*Lactobacillus GG*, *Bifidobacterium lactis*) методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) в жидкой и газовой средах. Проведена оценка эффективности применения бесконтактного режима АСМ для изучения влияния среды сканирования и времени инкубации образца на его параметры. Также представлены результаты экспериментальных исследований влияния свойств подложки на степень адгезии микроорганизмов на ее поверхность при сканировании в жидкости. Продемонстрирована принципиальная возможность применения современных методик АСМ для развития новых неразрушающих методов диагностики и визуализации биологических материалов, даже в условиях *in vitro*.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, бесконтактный режим, бактерия, адгезия.

RESEARCH OF BIOLOGICAL OBJECTS PARAMETERS BY ATOMIC FORCE MICROSCOPY

Polyakov V.V., Rubashkina M.V., Smirnov V.A., Polyakova V.V.

*Technological Institute of Southern Federal University in Taganrog,
Taganrog, Russia, e-mail: polyakov@fep.tti.sfedu.ru*

This work represents the results of the research of microorganisms (*Lactobacillus* , *Bifidobacterium*) with atomic force microscopy (AFM) method in liquid and air environment. Here is given the evaluation of the AFM noncontact mode to study the influence of the environment in which scanning is done and of the incubation period of sample upon its parameters. The results of the experimental researches of the substrate properties influence on a degree of the microorganisms adhesion to its surface during the process of scanning in liquid environment are given in this work.

Key words: atomic force microscopy, noncontact mode, bacteria, adhesion.

В последние годы большое внимание уделяется возможности использования биологических структур для получения новых материалов, биосенсоров и биоэлектронных устройств. В связи с этим важной задачей современной науки является исследование морфологии биологических объектов, так как именно размеры и форма во многом определяют принцип их функционирования. Новые возможности для исследования параметров биообъектов дает атомно-силовая микроскопия (АСМ), позволяющая проводить сканирование без специальной пробоподготовки, на воздухе или в жидкой среде [1].

Специальные конструкции сканирующих зондовых микроскопов, адаптированные для биологических исследований, такие как зондовая нанолaborатория Ntegra Vita (производитель – ЗАО «Нанотехнология-МДТ», г. Зеленоград), позволяют исследовать поверхность различных биологических объектов на воздухе и в жидких средах в сочетании с оптическим наблюдением процесса сканирования в реальном времени. Широкое распространение метода АСМ для изучения различных биоорганизмов связано с тем, что в отличие от других методов (оптической и электронной микроскопий) не требуется длительная, сложная и дорогостоящая подготовка образца.

Как известно, многие биообъекты обладают малой механической жесткостью, поэтому при исследовании необходимо свести до минимума возможность контакта зонда с их поверхностью. В связи с этим целями работы являются разработка методики определения параметров живых биологических объектов методом бесконтактной АСМ, а также изучение влияния среды на результаты АСМ-сканирования.

В качестве экспериментального образца использовалась биологически активная добавка «Бифиформ[®] Малыш» (производитель – «Ферросан А/С», Дания), форма выпуска – порошок. В состав порошка входили следующие компоненты: *Lactobacillus GG* (LGG) (10^9 КОЕ/г) – 3,33 мг, *Bifidobacterium lactis* (BB-12) (10^9 КОЕ/г) – 3,33 мг, Витамин В₁ – 0,40 мг, Витамин В₆ – 0,50 мг. Данный порошок разводился дистиллированной водой в соотношении 1:10. Исследования осуществлялись на зондовой нанолaborатории Ntegra Vita (производитель – ЗАО «Нанотехнология-МДТ», г. Зеленоград) с использованием поставляемых в комплекте принадлежностей и применением пакета прикладных программ Nova (1.0.26.1324). В качестве зонда применялся кремниевый кантилевер марки NSG 10.

Во время наблюдения данного образца с помощью встроенного инвертированного оптического микроскопа было обнаружено, что раствор порошка «Бифиформ» содержал большое количество подвижных бактерий, а также их достаточно крупные малоподвижные скопления, выделенные черной линией (рис. 1).

Исследование подвижных бактерий без применения специальных фиксаторов было невозможно, поэтому сканирование в полуконтактном режиме АСМ проводилось на малоподвижных скоплениях, АСМ-изображение которых показано на рис. 2. Анализ полученных АСМ-изображений проводился с использованием программного пакета Image Analysis 3.5 (ЗАО «Нанотехнология-МДТ», г. Зеленоград). В результате было показано, что исследуемый раствор содержал объекты овальной формы размерами 0,5–1,5 мкм, иногда в коротких цепочках длиной 1,0–5 мкм.



Рис. 1. Оптическая фотография раствора порошка «Бифиформ» с увеличением 25×

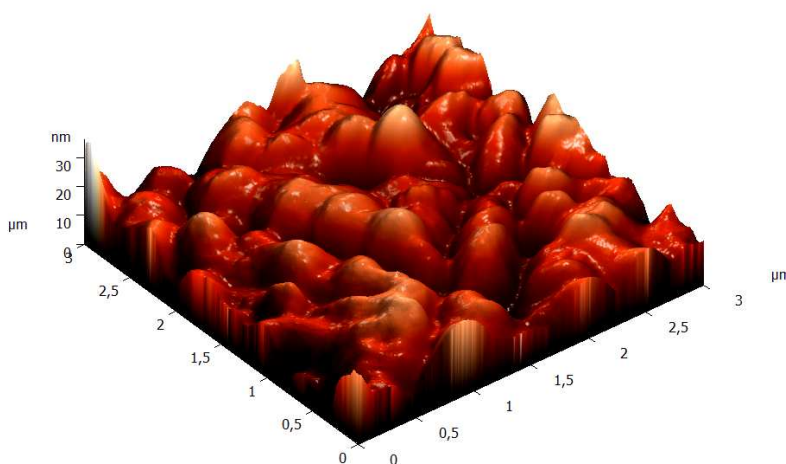
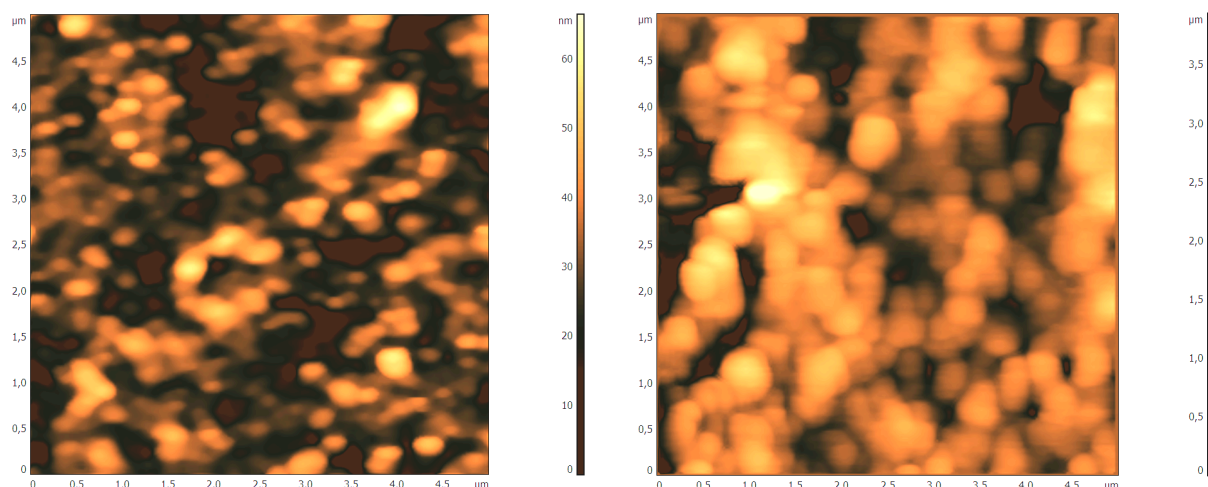


Рис. 2. АСМ-изображение раствора порошка «Бифиформ», полученное полуконтактным методом АСМ в жидкости

Следующим этапом работы являлось исследование зависимости параметров живых бактерий от времени инкубации. На рис. 3 показаны АСМ-изображения биологических

объектов раствора «Бифиформ», полученные полуконтактным методом АСМ в жидкости после одного часа инкубации (рис. 3а) и через 2 месяца инкубации (рис. 3б).



а)

б)

Рис. 3. АСМ-изображение раствора порошка «Бифиформ»: а) время инкубации 1 час; б) время инкубации 2 месяца

Анализ полученных АСМ-изображений показал, что наблюдается значительное увеличение количества бактерий и их размеров по истечении 2 месяцев инкубации. После одного часа инкубации наблюдались объекты овальной и сферической формы, объединенные в цепочки длиной 1–5 мкм. После 2 месяцев инкубации биологические объекты преимущественно имели сферическую форму диаметром 0,5–1 мкм и высотой до 200 нм [2].

Т.к. исследуемые биообъекты имели мягкую поверхность, то для минимизации повреждения исследуемого образца в процессе сканирования была разработана методика, основанная на использовании бесконтактного режима работы АСМ, который является частным случаем полуконтактного метода, когда зонд в результате подбора определенных параметров сканирования взаимодействует с поверхностью образца только за счет сил притяжения, и его контакт с поверхностью тем самым исключается. Такая методика имеет существенное преимущество при исследовании мягких, вязких или хрупких образцов, а также при использовании дорогостоящих зондов.

Для исследования влияния среды, в которой проходит сканирование, на получаемую с помощью метода АСМ морфологию биоорганизмов проводилось сканирование раствора порошка «Бифиформ® Малыш» бесконтактным методом АСМ в двух различных средах: на воздухе и в жидкости. В первом случае раствор осаждался на ситалловую подложку и высушивался в течение 20 минут в закрытой чашке Петри, во втором проводилось

непосредственное сканирование в капле данного раствора на подложках из различных материалов: предметное стекло, пластмасса (чашка Петри), ситалл и нержавеющая сталь (подложкодержатель жидкостной ячейки МР6LCNTF). Это позволило исследовать влияние свойств подложки, на которую осаждается раствор, на результаты сканирования и выявить зависимость степени адгезии исследуемого образца от выбора материала подложки.

Анализ полученных АСМ-изображений раствора порошка «Бифиформ» (рис. 4) показал, что бактерии при исследовании на воздухе (рис. 4а) имели меньшие геометрические размеры по сравнению с бактериями в жидкости (рис. 4б), что связано с высыханием мягкой оболочки биообъекта и искажением его формы. Результаты измерений в жидкости, с использованием разработанной методики (рис. 4б), хорошо коррелировали с результатами, полученными в полуконтактном режиме АСМ (рис. 3а).

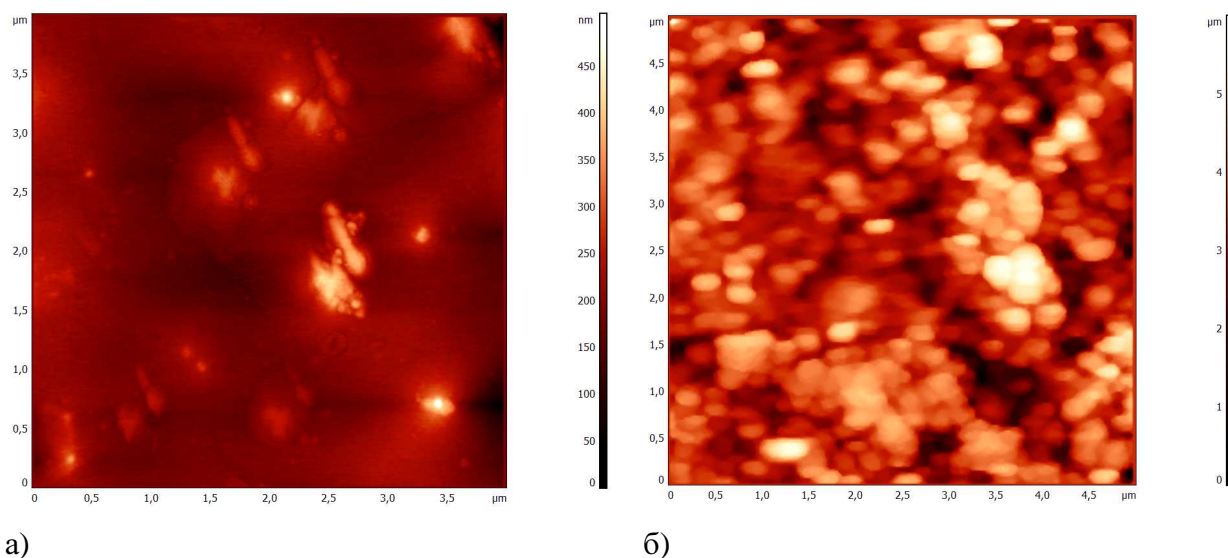


Рис. 4. АСМ-изображения раствора порошка «Бифиформ», полученные бесконтактным методом АСМ: а) на воздухе; б) в жидкой среде

В ходе проведенных ранее экспериментов было выявлено, что значительное влияние на результаты сканирования биообъектов в жидкости оказывают силы гидратации (гидрофобно-гидрофильное взаимодействие подложки и образца). Известно, что большинство биообъектов при взаимодействии с водой выставляют гидрофильные группы на внешнюю поверхность, поэтому можно предположить, что для хорошей адсорбции биообъектов на подложку необходимо использовать гидрофильные подложки [3]. Поэтому было проведено исследование адсорбции бактерий из раствора порошка «Бифиформ® Малыш» на поверхность подложки различных материалов. На рис. 5 приведены полученные АСМ-изображения.

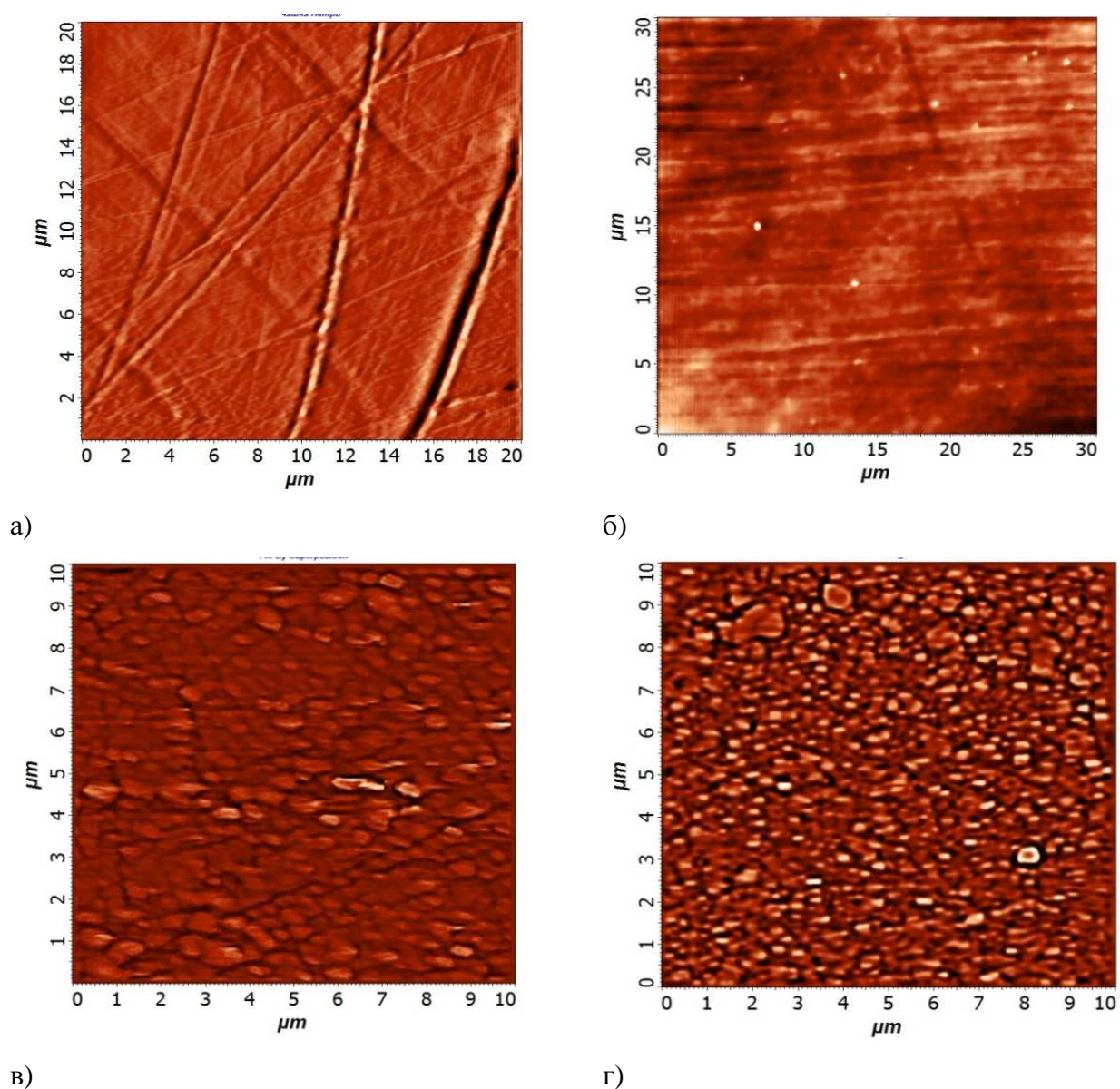


Рис. 5. АСМ-изображения поверхности раствора порошка «Бифиформ® Малыш», полученные на подложке: а) стеклянной; б) пластмассовой; в) ситалловой; г) металлической

Анализ данных изображений показал, что на гидрофобной пластмассовой подложке осаждение бактерий не наблюдалось (рис. 5а), на стеклянной – осаждение было незначительно (рис. 5б) и сила связи бактерий с подложкой мала. Ситалловая гидрофильная подложка обеспечивает осаждение бактерий преимущественно в один слой и выступает хорошим адсорбентом для биообъектов (рис. 5в). При использовании металлической подложки наблюдалось значительное осаждение бактерий в несколько слоев, что связано с высокой гидрофильностью окисного слоя на поверхности металла (рис. 5г) [4].

В результате проведенной работы показано, что бесконтактный режим АСМ в жидкости является наиболее перспективным режимом АСМ, который позволяет проводить исследования живых микроорганизмов без применения специальной пробоподготовки и с минимальным воздействием на их поверхность во время сканирования. Установлено, что для получения достоверных результатов измерений методом АСМ сканирование поверхности живых микроорганизмов необходимо проводить в условиях, близких к естественным, в данном случае – в жидкой среде. Показано, что выбор подложки играет определяющую роль при исследовании биообъектов методом АСМ, и для получения положительных результатов сканирования необходимо использовать гидрофильные подложки, т.к. они обеспечивают необходимую адгезию образца на свою поверхность. Полученные результаты могут быть использованы при разработке неразрушающих методов визуализации биологических объектов в условиях *in vitro*.

Список литературы

1. Morita S., Giessibl F., Sugawara Y., Hosoi H., Mukasa K., Sasahara A., Onishi H. Noncontact Atomic Force Microscopy and its related topics // Springer Handbook of Nanotechnology, Springer Berlin. – 2004. – 13. – P. 141–178.
2. Рубашкина М.В. Влияние свойств подложки на результаты исследований биологических объектов методом атомно-силовой микроскопии в жидкости // Материалы X Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов «Техническая кибернетика, радиоэлектроника и системы управления». – 2010. – С. 16.
3. Lindsay S. The scanning probe microscope in biology // Bonnell D. (Ed.) – 2001. – P. 289–335.
4. Поляков В.В., Смирнов В.А., Рубашкина М.В. Исследование параметров биологических объектов бесконтактным методом атомно-силовой микроскопии в жидкости // Труды международной научно-технической конференции и молодежной школы-семинара «Нанотехнологии – 2010». – 2010. – Ч. 2. – С. 251–253.

Рецензенты:

Агеев О.А., д.т.н., профессор, директор научно-образовательного центра «Нанотехнологии», г. Таганрог.

Рындин Е.А., д.т.н., профессор, ведущий научный сотрудник Южного научного центра РАН, зам. директора ООО «Центр нанотехнологий», г. Ростов-на-Дону.

Работа получена 16.09.2011