

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ МИКРОСКОПИИ В ИЗУЧЕНИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

¹Потатуркина-Нестерова Н.И., ²Немова И.С., ²Артамонова М.Н., ³Горельникова Е.А.,
⁴Куяров А.А., ⁵Потехина Л.П., ⁶Радаева О.А., ⁷Самышкина Н.Е.

¹ФГБОУ ВПО «Тольяттинский государственный университет», Тольятти, Россия (445667, г. Тольятти, Самарской обл., ул. Белорусская, 14), e-mail: potaturkinani@mail.ru

²ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», Ульяновск, Россия (432700, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42)

³ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова», Саратов, Россия (410012, г. Саратов, Театральная пл., 1), e-mail: novela@mail.ru

⁴ГБОУ ВПО «Сургутский государственный университет Ханты-Мансийского автономного округа Югры», Сургут, Россия (628412, Тюменская обл., ХМАО-Югра, г. Сургут, пр-т Ленина, 1), e-mail: kujarov@mail.ru

⁵ФГБУН «Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения РАН», Оренбург, Россия (460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11), e-mail: labpersist@mail.ru

⁶ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева», Саранск, Россия (430005, Республика Мордовия, г. Саранск ул. Большевикская, 68), e-mail: vtlbwbyf_79@mail.ru

⁷ФГБОУ ВПО «Челябинский государственный университет», Челябинск, Россия (454001, г. Челябинск, ул. Братьев Кашириных, 129), e-mail: samyshkina74@mail.ru

В статье рассмотрен вопрос применения атомно-силовой микроскопии и лазерной микроскопии в микробиологической диагностике. Высокое разрешение указанных методов позволяет использовать их для изучения архитектоники и особенностей строения, состава биопленок и межклеточных структур микроорганизмов. Атомно-силовая микроскопия позволяет изучить клеточные структуры, мембраны, вирусы, бактерии, ткани. Атомно-силовая микроскопия, лазерная микроскопия могут быть использованы для изучения физиологических процессов, таких как клеточный рост и прорастание спор, а также для исследования морфологических изменений живых бактерий под действием антибиотиков. Анализ литературных источников показал, что важным направлением является использование методов АСМ при оценке токсических действий, на моделях микроорганизмов, наноматериалов, применяемых в медицине. В качестве примеров представлены данные изучения живых объектов методами атомно-силовой микроскопии и лазерной микроскопии.

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

MODERN MICROSCOPY TECHNIQUES IN THE RESEARCH OF BIOLOGICAL OBJECTS

¹Potaturkina-Nesterova N.I., ²Nemova I.S., ²Artamonova M.N., ³Gorelnikova E.A.,
⁴Kuyarov A.A., ⁵Potekhina L.P., ⁶Radaeva O.A., ⁷Samyshkina N.E.

¹Togliatti State University, Togliatti, Russia (445667, Togliatti, Samara region. St. Belarus, 14), e-mail: potaturkinani@mail.ru

²Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russia (432700, Ulyanovsk, str. Tolstoy, 42)

³Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov, Saratov, Russia (410012, Saratov, Teatral'naya pl., 1), e-mail: novela@mail.ru

⁴Surgut State University - Khanty-Mansi Autonomous Okrug Ugra, Surgut, Russia (628412, Tyumenskaya obl., KhMAO-Yugra, Surgut, pr-t Lenina, 1), e-mail: kujarov@mail.ru

⁵Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis of the Urals Branch of the Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russia (460000, Orenburg, ul. Pionerskaya, 11), e-mail: labpersist@mail.ru

⁶Ogarev Mordovia State University, Saransk, Russia (430005, Republic of Mordovia, Saransk, Bolshevistskaya Str., 68), e-mail: vtlbwbyf_79@mail.ru

⁷Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia (454001, Chelyabinsk, str. Brat'ev Kashirinykh, 129), e-mail: samyshkina74@mail.ru

This article deals with a value of atomic force and laser microscopy in microbiological diagnostics. High resolution of these methods allows to use its for studying of architectonic and structure features, biofilms' composition and intercellular structures of microorganisms. Atomic force microscopy allows to research cellular structures, membranes, viruses, bacteria, tissues. Atomic force microscopy, laser scanning microscopy can be used for studying of the physiological processes such as cell growth and spore germination, as well as for research of morphological changes in living bacteria under the influence of antibiotics. The analysis of references

showed that the important direction is using of AFM methods at an assessment of toxic actions, on models of microorganisms, the nanomaterials applied in medicine. As examples results of the study of living objects by means of atomic force microscopy and laser microscopy are presented.

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

Важной задачей современной микробиологии является исследование морфологии биологических объектов, так как именно размеры и форма во многом определяют принцип их функционирования. Новые возможности для исследования параметров и морфологических признаков микроорганизмов дает атомно-силовая микроскопия (АСМ), позволяющая проводить исследование поверхности различных биологических объектов на воздухе и в жидких средах в сочетании с оптическим наблюдением процесса сканирования в реальном времени [3, 4, 5, 6, 8].

Широкое использование АСМ связано с важным преимуществом – нетребовательностью к электропроводности исследуемых образцов. Электронная сканирующая микроскопия позволяет получить 3D изображения поверхностных ультраструктур с молекулярным разрешением, в режиме реального времени и физиологических условиях, что значительно уменьшает количество времени, затраченное на исследование при традиционной световой микроскопии [7].

Методом АСМ можно изучить клеточные структуры, мембраны, вирусы, бактерии, ткани. Исследование подобных объектов 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 [2].

Существует много методов работы АСМ. В зависимости от характера силы, действующей между зондом и образцом, различают контактный, бесконтактный и прерывисто-контактный («полуконтактный») методы силовой микроскопии [11].

Режим прерывистого контакта позволяет повысить качество получаемого изображения. При таком способе сканирования с помощью пьезоэлектрического манипулятора осуществляются вынужденные механические колебания кантилевера с частотой, близкой к резонансной (обычно это десятки и сотни килогерц), и с амплитудой порядка 100 нм. В нижней точке колебаний остриё «касается» образца. При передвижении сканирующей иглы отслеживается изменение резонансной амплитуды кантилевера (она зависит от внешней силы). Данный метод позволяет повысить разрешение микроскопа при наблюдении объектов с пониженной механической жёсткостью, поскольку здесь устранено

влияние капиллярных сил. При таком методе также исключаются различные латеральные силы и силы трения, которые могут приводить к смещению структур на плоскости образца. Для улучшения качества изображения исследуемый объект погружали в жидкость [1,5].

При АСМ бактерии иммобилизируют на подложку, что приводит к появлению третьего параметра. Используя АСМ, возможно не только определять размеры бактерий, но и сравнивать их поверхностные рисунки. Сканирование в жидкости позволяет изучать влияние на бактериальные клетки антибиотиков и других медицинских препаратов. 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. Такие бактерии могут быть использованы в качестве штаммов-носителей при изготовлении живых векторных вакцин [4, 13].

В собственных исследованиях измерение топологии поверхности образцов проводили при помощи атомно-силового микроскопа SoSolver PP447 компании NTNT--MMDT в режиме прерывистого контакта с использованием поставляемых в комплекте принадлежностей и применением пакета прикладных программ Nova (1.0.26.1324). В качестве зонда использовали кремниевый кантилевер марки NSG 10. Объектом исследования являлись взвеси культур *Proteus spp.*, выделенные из фекалий обследованных с заболеваниями желудочно-кишечного тракта на фоне бластоцистной инвазии.

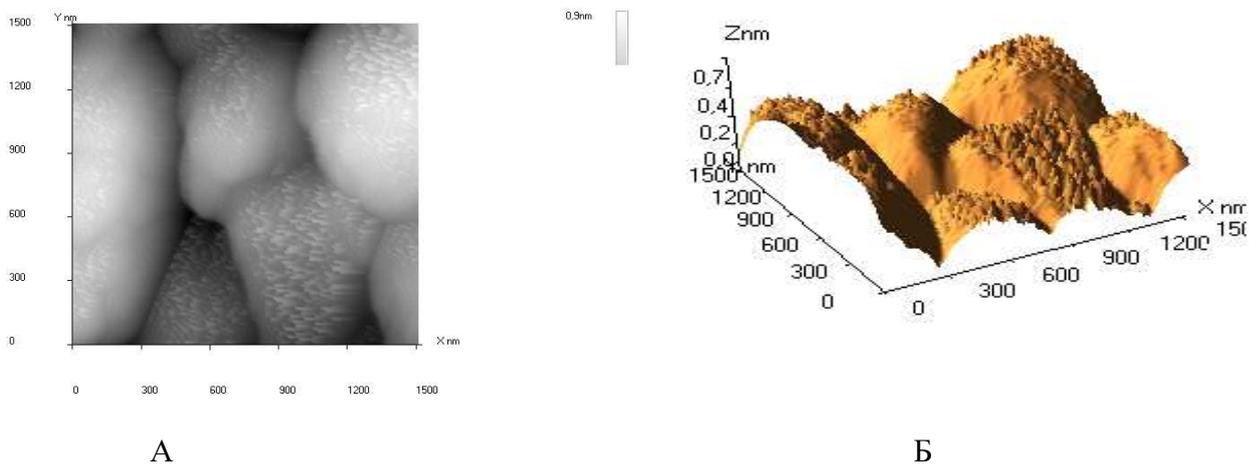


Рис. 1. *Proteus spp.* а – сканирующая электронная микроскопия; б – пространственное АСМ-изображение протей при площади сканирования (12×12 мкм²)

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 [4].

Для визуализации поверхности микробных клеток методами атомно-силовой микроскопии не требуются специальные подготовительные операции, обязательные для различных видов электронной микроскопии [12].

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 стекла, полимерные материалы и металлические поверхности. Варьируя подложки, можно изучать адгезивные свойства бактерий на поверхности различных материалов [9,10] (рис. 2).

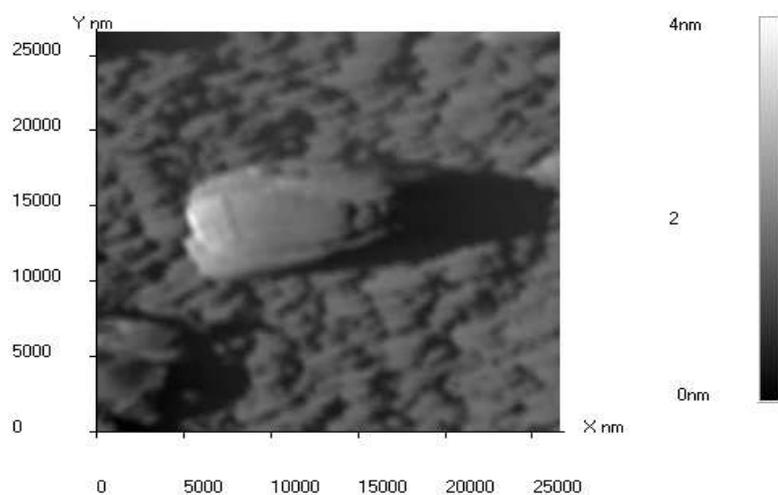


Рис. 2. Простейшие *Blastocystis hominis*: сканирующая электронная микроскопия

Для изучения биологических объектов в настоящее время активно используется лазерная микроскопия. Лазерная рентгеновская микроскопия – разновидность рентгеноструктурного анализа, основанного на дифракции рентгеновских лучей на исследуемом объекте. В отличие от традиционного рентгеноструктурного анализа, исследуются одиночные молекулы и их сочетания. Данный вид микроскопии позволяет получать изображения с разрешением в несколько нанометров [11]. В собственных исследованиях измерение топологии поверхности биологических объектов – клещей *Demodex folliculorum*, проводили при помощи микроскопа LEXT OLS 4000.

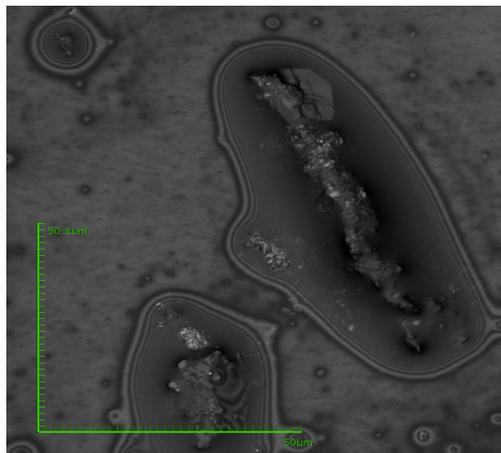


Рис. 3. Сканы получены лазерной микроскопией (микроскоп LEXT OLS 4000):
50x50 мкм скан микроскопического клеща *Demodex folliculorum*

Таким образом, методы атомно-силовой микроскопии, лазерной микроскопии имеют широкие перспективы в изучении морфологических свойств микробиологических объектов. Возможность изучения топографии, морфологии, ультраструктуры бактериальных клеток и вирусов позволит расширить знания о микроорганизмах. Высокое разрешение указанных выше методов позволяет использовать их для изучения архитектоники и особенностей строения, состава биопленок и межклеточных структур микроорганизмов.

Работа выполнена при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы (№14.В37.21.2010)

Список литературы

1. Бахтизин Р. З. Сканирующая туннельная микроскопия – новый метод изучения поверхности твердых тел // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – №11. – С. 83–89.
2. Большакова А. В., Воробьева Е. А. Сканирующая силовая микроскопия почвенных бактерий // Современные достижения бионаноскопии: тезисы докл. III Междун. конф. (16–18 июня 2009 г.). – Москва, 2009. – С.13.
3. Быков И. В. Развитие и автоматизация методов измерения рельефа и локальных свойств биологических объектов в атомно-силовой микроскопии: автореф. дис... канд. ф.-мат. наук. М., 2010. – 21 с.
4. Дерябин Д. Г., Васильченко А. С., Алешина Е. С. и др. Исследование взаимодействия углеродных наноматериалов с клетками *Escherichia coli* методом атомно-силовой микроскопии // Российские нанотехнологии. – 2010. – Т. 5, № 11–12. – С. 136–141.

5. Игнатов С. Г., Вирясов С. Н., Федюкина Г. Н. и др. Применение АСМ для специфической визуализации микроорганизмов // Молекулярная диагностика – 2007: тезисы докл. VI Всерос. научно-практ. конф. с междунар. участием. – М., 2007. – Т. 1. – С. 81-82.
6. Миронов В. Л. Основы сканирующей зондовой микроскопии: учебное пособие для студентов старших курсов высших учебных заведений. – Нижний Новгород: РАН. Институт физики микроструктур, 2004. – 114 с.
7. Плескова С. Н. Атомно-силовая микроскопия в биологических и медицинских исследованиях. – ИД: Интеллект, 2011. – 288 с.
8. Поляков В. В., Рубашкина М. В., Смирнов В. А. Исследование параметров биологических объектов методом атомно-силовой микроскопии // Известия ЮФУ. Технические науки. – 2011. – № 4. – С.193–198.
9. Роскошная А. С., Багров Д. В., Онищенко Г. Е. и др. Применение атомно-силовой микроскопии для визуализации внутренней структуры клеток // Современные достижения бионаноскопии: тезисы докл. III Междун. конф. (16–18 июня 2009 г.). – М., 2009. – С.47.
10. Уткин Т. В., Бугоркова О. С., Кузнецов Н. А. и др. Современные возможности изучения ультраструктуры клеток // Известия Саратовского университета. Сер. Физика. – 2012. – Т.12. – С.36.
11. Феофанов А. В. Спектральная лазерная сканирующая конфокальная микроскопия в биологических исследованиях // Успехи биологической химии. – 2007. – Т.47. – С.371-410.
12. Филатов Д. О., Круглов А. В., Гущина Ю. Ю. Исследование топографии поверхностных твердых тел методом атомно-силовой микроскопии в неконтактном режиме. Описание лабораторной работы. – Н.Новгород: Нижегородский государственный университет, 2003. – С.5.
13. 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.

Рецензенты:

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

Нестеров А. С., д.м.н., профессор кафедры инфекционных и кожно-венерических болезней ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск.