

Раздел IV. Биомедицинские нанотехнологии

УДК 621.38-022.532

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

ИССЛЕДОВАНИЕ ПАРАМЕТРОВ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

*Представлены результаты исследования микроорганизмов (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) в жидкой и воздушной средах. Показана эффективность применения бесконтактного режима АСМ для изучения влияния среды сканирования и времени инкубации образца на его параметры. Представлены результаты экспериментальных исследований влияния материала 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*.*

Атомно-силовая микроскопия; бесконтактный режим; бактерия; адгезия.

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

RESEARCH OF BIOLOGICAL OBJECTS PARAMETERS BY ATOMIC FORCE MICROSCOPY

*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. The possibility of application of the modern techniques ACM for development of new nondestructive methods of diagnostics and visualization of biological materials is shown, even in conditions *in vitro*.*

Atomic force microscopy, noncontact mode, bacteria, adhesion.

Проблема разработки новых методов исследования биологических объектов и механизмов их функционирования представляет собой предмет прикладных исследований как в области медицинских и биологических наук, так и в области электроники и нанобиотехнологии. Все большее внимание в современной науке уделяется возможности использования биологических структур для получения новых перспективных материалов и биоэлектронных устройств. Поэтому разработка и развитие новых неразрушающих методов, позволяющих на микро- и наноуровне исследовать живые биологические объекты в условиях, близких к естественным, представляется важной и актуальной задачей.

Ранее изучение биообъектов проходило только с помощью оптического и электронного микроскопов, что давало возможность определить лишь геометрические размеры образцов, прошедших сложный процесс подготовки. При этом исследование живых объектов без нарушения их структуры не представлялось возможным.

В настоящее время наиболее перспективным методом исследования биологических объектов является атомно-силовая микроскопия (АСМ). Данный метод по-

зволяет исследовать различные биообъекты без применения дополнительной прободоподготовки. Кроме того, метод АСМ дает возможность для исследований живых систем в условиях максимально приближенных к естественным, что позволяет получать не только геометрические параметры, но и изучать процессы жизнедеятельности отдельных организмов, а также их взаимодействий между собой [1, 2]. Основными трудностями при проведении таких исследований является наличие у большинства биологических объектов мягкой, хрупкой оболочки, которую можно легко повредить при контакте зонда с ее поверхностью, что ведет к гибели образца, и малая адгезия биообъектов с подложкой при их исследовании в жидких средах. Одним из возможных способов решения первой проблемы является использование бесконтактного режима АСМ, который минимизирует возможность механического контакта зонда с поверхностью образца, вторая же проблема требует проведения дополнительных исследований.

Целью работы является исследование влияния среды и материала подложки на геометрические параметры живых биологических объектов, полученных сканированием в бесконтактном режиме АСМ.

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 – 0,4 мг, Витамин В₆ – 0,5 мг. Данный порошок разводился дистиллированной водой в соотношении 1:10.

Исследования проводились на зондовой нанолаборатории (ЗНЛ) Ntegra Vita (производитель – ЗАО «Нанотехнология-МДТ», г. Зеленоград), которая позволяет одновременно исследовать объект в инвертированном оптическом и в атомно-силовом микроскопах. В качестве зонда применялся кремниевый кантилевер марки NSG 10.

Экспериментальные исследования образца проводились методом АСМ в бесконтактном режиме (БК-АСМ) таким образом, что путем подбора определенных параметров сканирования (в программе Nova – параметры Mag и Phase) зонд находился только в области сил притяжения, и его контакт с поверхностью образца исключался. Такая методика имеет существенное преимущество при исследовании образцов, обладающих хрупкой или вязкой оболочкой.

На начальном этапе работы было изучено влияние среды, в которой проходит сканирование, на получаемую с помощью метода АСМ морфологию биоорганизмов. Для этого раствор порошка «Бифиформ® Малыш» исследовался 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 MP6LCNTF). Это позволило исследовать влияние свойств подложки, на которую осаждается раствор, на результаты сканирования и выявить зависимость степени адгезии исследуемого образца от выбора материала подложки.

Для изучения зависимости параметров живых микроорганизмов от времени инкубации бесконтактным методом АСМ в жидкости проводилось сканирование исследуемого раствора при времени инкубации 1 час и 2 месяца. Все время выдержки раствор находился в закрытой пробирке при комнатной температуре и в условиях достаточной освещенности. Обработка полученных АСМ-изображений производилась с использованием программного пакета Image Analysis 3.5 (ЗАО «Нанотехнология - МДТ», г. Зеленоград).

Результаты исследования влияния среды сканирования на геометрические параметры поверхности микроорганизмов раствора порошка «Бифиформ® Малыш» представлены на рис. 1.

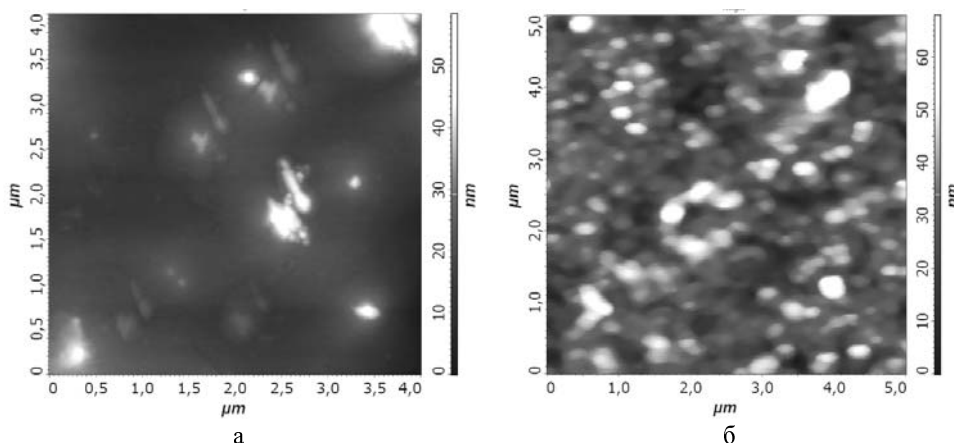


Рис. 1. АСМ-изображения поверхности раствора порошка «Бифиформ® Малыш», полученные бесконтактным методом АСМ: а – на воздухе; б – в жидкой среде

Анализ полученных АСМ-изображений показал, что при сканировании на воздухе (рис. 1,а) микроорганизмы имели геометрические параметры, отличные от ожидаемых, что связано с высыханием мягкой оболочки биообъектов и искажением их структуры. При исследовании в жидкой среде (рис. 1,б) были обнаружены одиночные объекты овальной формы длиной 0,5 мкм и их небольшие скопления, что соответствовало ожидаемой морфологии бактерий раствора порошка «Бифиформ® Малыш».

На рис. 2 приведено оптическое изображение малоподвижных скоплений бактерий, полученное с помощью встроенного в ЗНЛ Ntegra Vita инвертированного оптического микроскопа Olympus IX71. Сканирование бактерий проводилось на этих скоплениях, так как отдельные бактерии были достаточно подвижны, и их исследование без специальных фиксаторов являлось затруднительным.



Рис. 2. Оптическая фотография поверхности раствора порошка «Бифиформ® Малыш» с увеличением $\times 25$

На рис. 3 представлены АСМ-изображения и профилограммы поверхности раствора порошка «Бифиформ® Малыш» после одного часа инкубации (рис. 3,а) и через 2 месяца инкубации (рис. 3,б). Анализ полученных АСМ-изображений показал, что наблюдается значительное увеличение количества бактерий и их размеров по истечению 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 [3].

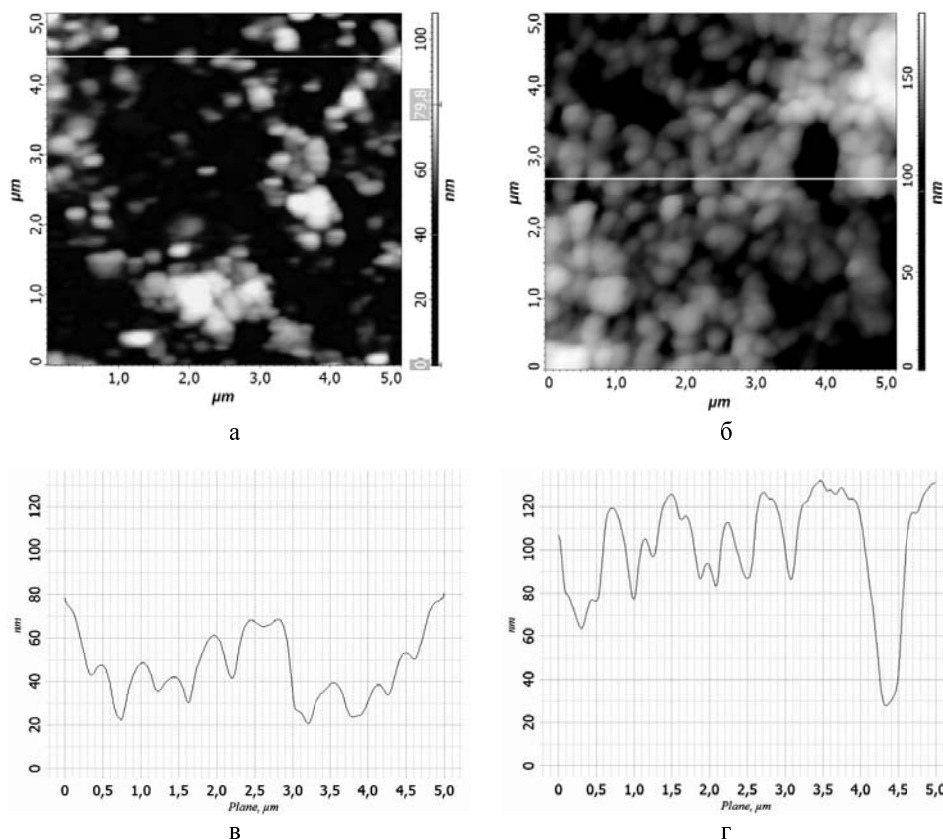


Рис. 3. АСМ-изображения и профилограммы поверхности раствора порошка «Бифиформ® Малыш»: а – время инкубации 1 час; б – время инкубации 2 месяца

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 [4]. Поэтому было проведено исследование адсорбции бактерий из раствора порошка «Бифиформ® Малыш» на поверхность подложки различных материалов. На рис. 4 приведены полученные АСМ-изображения.

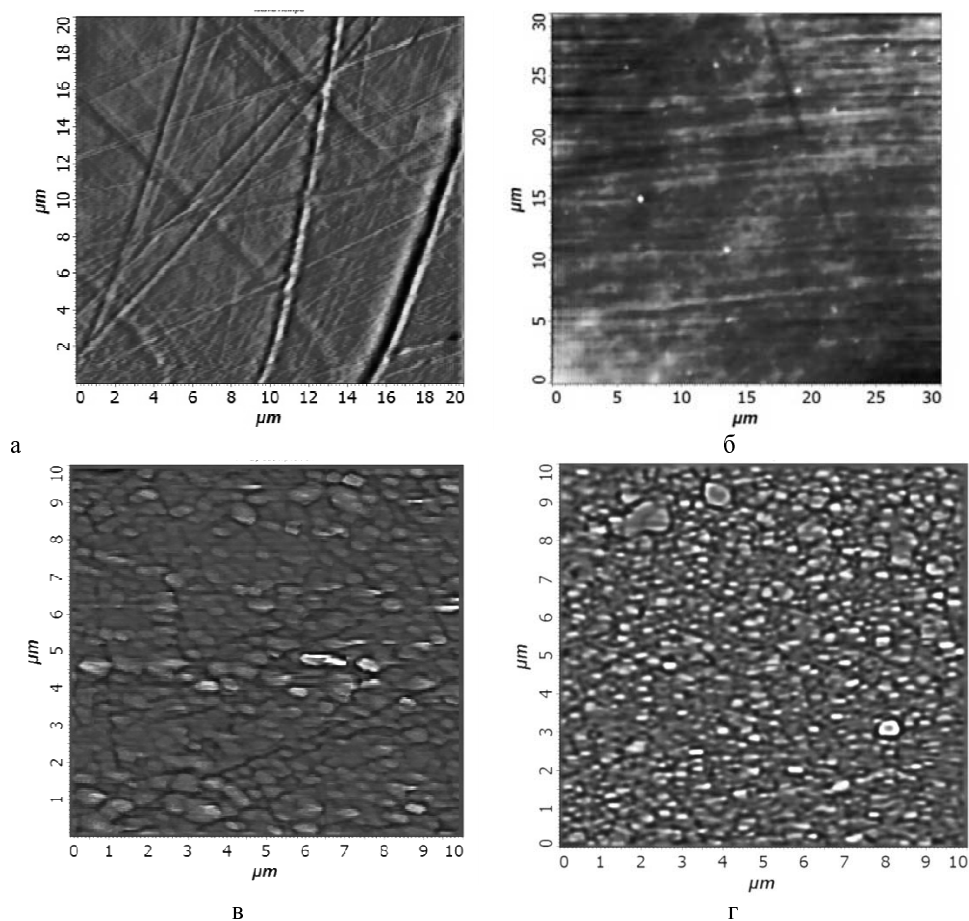


Рис. 4. АСМ-изображения поверхности раствора порошка «Бифиформ® Малыш», полученные на подложке: а – стеклянной; б – пластмассовой; в – силикатной; г – металлической

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

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 скани-

рования необходимо использовать гидрофильные подложки, так как они обеспечивают необходимую адгезию образца на свою поверхность. Полученные результаты могут быть использованы при разработке неразрушающих методов визуализации биологических объектов в условиях *in vitro*.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Козырев С.В., Якуцени П.П.* Биомедицинские приложения СЗМ: наноскопия, нанодиагностика и нанотехнология // Российские нанотехнологии. – 2008. – Т. 3, № 3-4. – С. 47-50.
2. *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.
3. *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.
4. *Lindsay S.* The scanning probe microscope in biology // Bonnell, D. (Ed.) – 2001. – P. 289-335
5. *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.

Статью рекомендовал к опубликованию д.ф.-м.н. А.А. Лаврентьев.

Поляков Вадим Витальевич

Технологический институт федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Южный федеральный университет» в г. Таганроге.

E-mail: polyakov@fep.tti.sfedu.ru.

347928, г. Таганрог, ул. Шевченко, 2.

Тел.: 88634371611.

Кафедра технологии микро- и нанoeлектронной аппаратуры; к.т.н.; доцент.

Смирнов Владимир Александрович

E-mail: sva@fep.tti.sfedu.ru.

Кафедра технологии микро- и нанoeлектронной аппаратуры; к.т.н.; доцент.

Рубашкина Марина Владимировна

E-mail: marina-rubashkina@yandex.ru.

Кафедра технологии микро- и нанoeлектронной аппаратуры; магистрантка.

Polyakov Vadim Vital'evich

Taganrog Institute of Technology – Federal State-Owned Autonomy Educational Establishment of Higher Vocational Education “Southern Federal University”.

E-mail: polyakov@fep.tti.sfedu.ru.

2, Shevchenko Street, Taganrog, 347928, Russia.

Phone: +78634371611.

The Department of Micro- and Nanoelectronics; Associate Professor.

Smirnov Vladimir Alexandrovich

E-mail: sva@fep.tti.sfedu.ru.

The Department of Micro- and Nanoelectronics; Associate Professor.

Rubashkina Marina Vladimirovna

E-mail: marina-rubashkina@yandex.ru.

The Department of Micro- and Nanoelectronics; Undergraduate.