

Ерохин Павел Сергеевич

**АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ КАК ИНСТРУМЕНТ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БАКТЕРИЙ К ФАКТОРАМ БИОТИЧЕСКОЙ И
АБИОТИЧЕСКОЙ ПРИРОДЫ**

03.01.02 – биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Саратов 2015

Работа выполнена в Саратовском государственном университете им. Н.Г. Чернышевского,
г. Саратов.

Научный руководитель: Заслуженный деятель науки РФ,
доктор физико-математических наук,
профессор Тучин Валерий Викторович

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук,
профессор Байбурин Вил Бариевич, ФГБОУ
ВПО Саратовский ГТУ имени Ю.А.
Гагарина
доктор биологических наук, ведущий
научный сотрудник лаборатории
иммунохимии Л.А. Дыкман ФГБУН
Институт биохимии и физиологии растений
и микроорганизмов РАН.

Ведущая организация: ГБОУ ВПО «Саратовский государственный
медицинский университет имени
В.И. Разумовского» Министерства
здравоохранения и социального развития
РФ, г. Саратов

Защита состоится «28» апреля 2015 в 15³⁰ на заседании Диссертационного Совета Д
212.243.05 при Саратовском государственном университете по адресу 410012, Саратов, ул.
Университетская, 40.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Саратовского
государственного университета.

Автореферат разослан «__» _____ 2015.

Ученый секретарь
Диссертационного совета



Дербов В.Л.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

АКТУАЛЬНОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЙ. Одними из наиболее современных методов, позволяющими производить измерения морфологических, геометрических, механических характеристик материалов и диагностику особенностей малоразмерных систем, относятся электронная и сканирующая зондовая микроскопия (СЗМ). СЗМ включает в себя сканирующую туннельную микроскопию и спектроскопию, а также различные варианты сканирующей силовой микроскопии (ССМ), в частности – атомно-силовую микроскопию (АСМ). Это обусловлено тем, что АСМ представляет собой удобный и надежный инструмент для исследования морфологических, геометрических, механических свойств объектов биологической и небиологической природы на молекулярном уровне с высоким пространственным разрешением. В практике микробиологических исследований АСМ появилась в конце XX века, а к началу XXI века дополнила микробиологические методы, позволяя получать уникальную информацию о свойствах изучаемых объектов.

Важным преимуществом атомно-силовой микроскопии является нетребовательность к электропроводности исследуемых объектов. В основу АСМ заложена регистрация межатомного взаимодействия между поверхностью исследуемого образца и наноразмерным острием кантилевера. Кроме того, методы СЗМ в отличие от электронной микроскопии не требуют длительной подготовки образца к исследованию, этапов окрашивания, но дают возможность изучать трехмерную геометрию поверхности исследуемого объекта с нанометровым пространственным разрешением.

С использованием АСМ появились исследования по изучению морфофункциональных особенностей отдельных бактериальных клеток, определению степени воздействия на микробы различных факторов биотической и абиотической природы.

Так, рядом авторов, с использованием атомно-силовой микроскопии изучили воздействие антибактериальных препаратов на клеточную стенку бактерий.

Ряд исследователей успешно использовали полуконтактный метод АСМ для визуализации взаимодействия антигена с антителом и бактерии с бактериофагом.

Сказанное выше показывает возрастающий интерес исследователей к использованию АСМ при изучении микроорганизмов, так как позволяет получать комплексную надежную количественную информацию о физической природе процессов, протекающих в биологических объектах.

В то же время имеющиеся данные свидетельствуют и о возможных ограничениях или искажениях результатов АСМ. Некоторые проблемы возникают при применении методов

СЗМ при работе с возбудителями инфекционных заболеваний, поскольку подразумевается выполнение ряда дополнительных мер, обеспечивающих биологическую безопасность исследователя, но сохраняя при этом морфологию и ультраструктуру микроорганизма.

Использование АСМ при решении вопросов, связанных с изучением морфо-функциональных особенностей бактериальных клеток, как в физиологическом состоянии, так и при воздействии различных факторов, а также особенностей формирования микробных сообществ (биопленок) является актуальным направлением развития современных методов микробиологического исследования. Изучение биологических объектов методами атомно-силовой микроскопии предполагает оптимизацию методических подходов для характеристики препаратов с целью получения четких, информативных данных об объекте исследования.

Цель работы - изучение морфо-функциональных характеристик микроорганизмов и их сообществ (биопленок) при воздействии различных факторов биотической и абиотической природы с использованием методов атомно-силовой микроскопии.

Задачи исследования:

- 1) Разработать алгоритм определения оптимальных диапазонов основных параметров сканирования (**Amplitude, Phase, Frequency, Set Point, FB Gain**) микроорганизмов в режимах прерывистого и непрерывного контакта АСМ, позволяющих получать максимальную информацию об объекте исследования;
- 2) Разработать методику обработки изображений, с использованием модуля **Image Analysis**, которая позволяет получить объединенное изображение более высокого качества и содержащее полную информацию об образце;
- 3) С использованием методов атомно-силовой микроскопии изучить влияние антибиотика, а также кислотного и «щелочного» стресса на образование бактериальной биопленки;
- 4) Исследовать процесс образования биопленки грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов с помощью методов атомно-силовой микроскопии;
- 5) Оценить влияние поверхностных белковых структур микроорганизмов на альтернативные подложки – мембраны из хитозана.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА РАБОТЫ:

Разработан алгоритм определения оптимальных диапазонов основных параметров сканирования (**Amplitude, Phase, Frequency, Set Point, FB Gain**) для изучения морфо-функциональных характеристик микроорганизмов и их сообществ (биопленок) с помощью АСМ.

Разработана методика обработки АСМ изображений микробиологических объектов с использованием модуля **Image Analysis**, включающая этапы, которые способствуют получению объединенного изображения более высокого качества и содержащего полную информацию об образце.

Показано, что аддитивные (неинвазивные) методы фиксации не меняют морфологии клетки, а методы денатурирующей фиксации искажают особенности морфологии и ультраструктуры клеток микроорганизмов. Продемонстрирована возможность использования аддитивных методов фиксации при исследовании с помощью АСМ микроорганизмов I-IV групп патогенности.

С применением АСМ оценена морфо-функциональная реакция бактериальных клеток *E.coli* на воздействие антибиотика Цефазолин-АКОС. Показано, что под влиянием антибиотика формируется гетерогенность морфологических свойств популяций *E.coli* и дезорганизация поверхностных клеточных структур. Дозы антибиотика, не вызывающие глубоких нарушений, способствуют образованию микробных биопленок.

Комплекс трех количественных показателей (индекса I, определяющего защиту бактериальной клетки, шероховатости, силы адгезии) позволяет достоверно и объективно выявлять различия в морфологических, геометрических, механических характеристиках (индекс I, шероховатость, сила адгезии) бактерий организованного сообщества микроорганизмов (биопленки).

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ:

Разработанный алгоритм определения оптимальных диапазонов основных параметров сканирования (**Amplitude, Phase, Frequency, Set Point, FB Gain**) позволяет минимизировать артефакты механической природы и аппаратные шумы, при изучении морфо-функциональных характеристик микроорганизмов и их сообществ (биопленок) в режимах прерывистого и непрерывного контакта, что повышает достоверность, воспроизводимость и надежность полученных данных об объекте исследования.

Разработана методика обработки изображений с использованием модуля **Image Analysis**, которая позволяет получить объединенное изображение более высокого качества и содержащего полную информацию об образце.

Комплекс трех количественных показателей (индекса I, определяющего защиту бактериальной клетки, шероховатости, силы адгезии) позволяет оценивать различия в биофизических показателях бактерий организованного сообщества микроорганизмов (биопленки), а также влияние поверхностных белковых структур микроорганизмов на альтернативные подложки – мембраны из хитозана.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ.

Разработан алгоритм определения оптимальных диапазонов основных параметров исследования микроорганизмов методом атомно-силовой микроскопии с использованием оптимизированных параметров. По результатам работы составлены методические рекомендации «Оптимизация параметров исследования микроорганизмов методом атомно-силовой микроскопии», одобрены Ученым Советом ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» и утверждены директором ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» 22.10.2013 г., протокол № 6.

Оценена возможность использования аддитивных методов фиксации при исследовании с помощью АСМ микроорганизмов I-IV групп патогенности. Результаты работы представлены в методических указаниях «Организация работы лабораторий, использующих методы электронной и атомно-силовой микроскопии при исследовании культур микроорганизмов I-IV групп патогенности» (Утверждены и введены в действие Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации, Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации 16.08.2013 г.)).

Результаты работы используются в научных исследованиях при выявлении и характеристике субклеточных структур микроорганизмов и микробных сообществ – биопленок, получая их биофизические характеристики. Кроме того, результаты работы дают возможность тестирования новых химических соединений в качестве антибактериальных, антисептических и дезинфицирующих средств на основе широкого спектра биофизических показателей.

АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ. Основные результаты, изложенные в диссертации, докладывались и обсуждались на конференциях РосНИПЧИ «Микроб» (2010-2014 гг.), ежегодных симпозиумах и конференциях по электронной микроскопии Российской академии наук (Черноголовка 2010, 2011, 2013, 2014 гг.), международных конференциях: «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2010 г.), «Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине» (Саратов, 2011 г.), «Математические методы в технике и технологиях - 25» (Саратов, 2012-2013 гг.), «Современные биоинженерные и ядерно-физические технологии в медицине» (Саратов, 2012), «Нанотехнологии – производству» (Фрязино, 2013 г.), «Современные технологии в совершенствовании мер предупреждения и ответных действий на чрезвычайные ситуации в области общественного здравоохранения санитарно-эпидемиологического характера» (Саратов, 2012 г.), «Окружающая среда и здоровье» (Саратов, 2012 г.), «Современные достижения бионаноскопии» (Москва, 2014 г.), Всероссийской научно-практической конференции «Инновационные технологии в

противоэпидемической защите населения» (Нижний Новгород, 2014 г.), Международной конференции молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика» (Пушино, 2014).

ПУБЛИКАЦИИ. По теме диссертации опубликовано 22 работы, 5 из которых в журналах, рекомендованных ВАК Российской Федерации, 17 тезисов в сборниках тезисов научных конференций.

СТРУКТУРА И ОБЪЕМ РАБОТЫ. Диссертация состоит из введения, основной части, содержащей 5 глав, заключения и списка цитируемой литературы, включающей 209 наименований, из которых 35 опубликованы на русском языке, 174 – в иностранной печати, содержит 41 рисунок и 7 таблиц. Объем диссертации составляет 126 страниц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность темы, изложены цель и задачи исследования, кратко изложено содержание работы и сформулированы основные положения, выносимые на защиту.

В **первой** главе проведен анализ имеющейся литературы, показано, что атомно-силовая микроскопия является привлекательным методом при исследовании микроорганизмов. С одной стороны АСМ дополняет методы микробиологического исследования, а с другой - позволяет получать значительное количество уникальной информации о свойствах биологического объекта. Для микроорганизмов наиболее распространенным режимом АСМ, применимым для исследования морфологии и изучения поверхностных ультраструктур, является режим прерывистого контакта, включающий методы: отображения рельефа, рассогласования и отображения фазы. Проведенное рядом авторов изучение микроорганизмов позволило подтвердить линейные размеры некоторых бактерий, наличие флагеллярного аппарата, количественные характеристики капсул (по изменению фазы колебаний кантилевера при переходе границы раздела бактерия-капсула-подложка) для капсульных микроорганизмов. В то же время накопленные данные по этим вопросам свидетельствуют и о возможных ограничениях, которые возникают в процессе решения иных вопросов микробиологической практики. Широкий диапазон задач, направленных на углубленное изучение многих свойств микроорганизмов с использованием АСМ является актуальным направлением развития современных микробиологических методов исследования. Сложность выполнения атомно-силовой микроскопии биологических

объектов предполагает оптимизацию методических подходов для упрощения и ускорения необходимых исследований.

Во **второй** главе представлены материалы и методы исследований. Для изучения методом АСМ ультраструктуры, морфологических, геометрических и механических характеристик бактерий, влияния факторов биотической и абиотической природы на микроорганизмы были использованы штаммы бактерий *E.coli M-17*, *S.aureus A-100*, *B.cereus*, выбранные в качестве примеров грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов.

Культивирование бактерий проводилось в зависимости от особенностей эксперимента. Применяли два варианта выращивания микроорганизмов. Чистоту выращенной культуры проверяли в световой микроскопии в мазках, окрашенных по Граму.

Бактерии в одном случае культивировали на LB бульоне или LB агаре в течение 24-48 ч при температуре 37⁰С. Далее бактериальную массу фиксировали и обеззараживали в забуференном растворе глутарового альдегида рН 7,2-7,4 в конечной концентрации 2,5% с экспозицией в течение 2 ч при температуре 4⁰С, а для спорообразующих микроорганизмов использовали забуференный раствор глутарового альдегида рН 8,0 в конечной концентрации 5% с экспозицией в течение 3 ч при температуре 25⁰С. Затем бактериальные клетки осаждали центрифугированием в течение 20 мин при 6000 об/мин, удаляли надосадочную жидкость и добавляли бидистиллированную воду в объеме 1 мл, ресуспендировали и повторно центрифугировали в течение 20 мин при 6000 об/мин. На покровное стекло наносили 4 мкл суспензии и высушивали при комнатной температуре.

Во втором случае бактерии культивировали на подложке (покровное стекло), которую помещали в стерильные чашки Петри и заливали 10 мл LB бульона. После посева культуры образцы выдерживали 24 ч в термостате при температуре 37⁰С. Затем отбирали питательную среду в емкость для отходов, а в чашку Петри для фиксации добавляли забуференный раствор глутарового альдегида в конечной концентрации 2,5% с экспозицией в течение 2 ч при температуре 4⁰С. Для спорообразующих микроорганизмов добавляли раствор глутарового альдегида рН 8.0 в конечной концентрации 5% с экспозицией в течение 3 ч при температуре 25⁰С. После этого фиксатор сливали в емкость для отходов, а покровные стекла дважды промывали в дистиллированной воде и переносили в чистые чашки Петри.

Для исследования биопленок микроорганизмов, культуру выращивали на круглом покровном стекле, помещенном в чашки Петри, в течение 24 ч при температуре 37⁰С. Дополнительный контроль проводили в световом микроскопе с окраской препарата по Граму.

Альтернативные подложки готовили из порошкообразного хитозана (ЗАО «Биопрогресс», Россия), молекулярной массой 200 кДа. 10 мг хитозана растворяли в 10 мл деионизованной воды. Полученный раствор равномерно распределяли в чашке Петри, диаметром 90 мм и высушивали при температуре 24-25°C.

Модификацию мембран из хитозана осуществляли путем нанесения на поверхность раствора видоспецифического антигена чумного микроба – капсульного антигена (фракции I - FI) и/или специфических антител к нему в концентрации 1 мг/мл. Обработанную мембрану инкубировали в течение 30 мин в термостате при температуре 37°C.

Изучение проводилось на сканирующем зондовом микроскопе Solver P47-PRO (NT-MDT, Россия), подключенному к ПК, с использованием кремниевых кантилеверов NSG01 (NT-MDT, Россия), напыленных золотом, для полуконтактной АСМ (резонансная частота кантилевера составляла 120 кГц, константа жесткости – 5,5 Н/м) и CSG10 (NT-MDT, Россия) для контактной АСМ (резонансная частота кантилевера составляла 20 кГц, константа жесткости – 0,1 Н/м). Исследования проводились в режимах прерывистого и непрерывного контакта АСМ следующими методами: полуконтактным, рассогласования, отображения фазы, постоянной силы, латеральных сил, модуляции силы.

Отдельные этапы экспериментов выполняли с помощью светового микроскопа (Carl Zeiss, Германия) с использованием программного обеспечения Axio Imager (Carl Zeiss, Германия).

Для обработки АСМ изображений использовалась программа Nova (NT-MDT, Россия), позволяющая редактировать полученные АСМ изображения, а также представлять их в двух- (2D) и трехмерном (3D) формате.

Статистическая обработка результатов проводилась в программах Nova (NT-MDT, Россия), Origin 5.0, Microsoft Excel, по 10 значениям характеристик бактерий, полученных в эксперименте. Графическая обработка осуществлялась с использованием программного обеспечения Image Analysis и Corel Draw X3.

В **третьей** главе проведена разработка алгоритма определения оптимальных диапазонов основных параметров сканирования (**Amplitude, Phase, Frequency, Set, Point, FB Gain**) микроорганизмов в режимах прерывистого и непрерывного контакта АСМ. С целью быстрого подбора значений параметров сканирования получали изображение при заданном значении параметрам исследования. В случае наличия артефактов механической природы, значение параметра изменялось на шаг измерения. Силы, приложенные к биологическим объектам, могут быть минимизированы выбором соответствующего диапазона указанных параметров сканирования. При адаптации амплитуды колебаний кантилевера исследования выполнялись в диапазоне от 10 до 50 единиц с шагом в 5 единиц на примере

грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов (*E.coli*, *S.aureus*). Было показано, что в диапазоне 10-20 единиц обратная связь не обеспечивала качественную обработку полученных данных в режиме прерывистого контакта, а в диапазоне 20-25 единиц получали воспроизводимые результаты, увеличение амплитуды колебаний кантилевера до 50 единиц (уменьшение области притяжения) приводило к монотонному возрастанию шумов аппаратуры. Для режима непрерывного контакта оптимальными значениями амплитуды колебаний кантилевера в наших исследованиях являлись 2,5-3 единицы.

Унификация начальной фазы колебаний кантилевера, как в режиме прерывистого, так и в режиме непрерывного контакта проводилась в диапазоне от 0 до 360° с шагом изменения величины 10° . Как показали наши многочисленные данные, оптимальными значениями начальной фазы колебаний кантилевера являлись $70-120^{\circ}$ ($250-330^{\circ}$) для режима прерывистого контакта и метода модуляции силы АСМ. Адаптация скорости сканирования грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов и их сообществ проводилась в диапазоне от 0,1 до 3 Гц с шагом изменения величины 0,1 Гц. Установление частоты сканирования объекта исследований на уровне 0,5-0,8 Гц способствует получению высококонтрастного изображения, воспроизводимых результатов, а также позволяет оценивать мелкие детали структуры объекта исследования. Особую роль играет величина **Set Point** и начальный уровень сигнала **DFL**, так как определяют величину взаимодействия зонда с поверхностью образца. Проведенные нами исследования показали, что для изучения грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов и их сообществ в режиме непрерывного контакта оптимальное значение этого параметра соответствовало 2,5-7,5 единицам. Скорость обработки данных обеспечивает возможность анализировать полученные результаты как в режиме прерывистого, так и непрерывного контакта. Для микроорганизмов нами определен оптимальный диапазон **FB Gain** 0,4-1,2 единиц, при котором получается высококонтрастное изображение. Установление значений коэффициента цепи обратной связи свыше 1,2 создает большое количество артефактных линий и вкраплений, обусловленных неустойчивостью работы и генерацией цепи обратной связи, создаваемых в результате попадания кантилевера в область высоких сил отталкивания с низкой скоростью обработки петли обратной связи.

Подобранные оптимальные диапазоны значений параметров сканирования бактерий (таблица 1) обеспечивают предпочтительный режим изучения микроорганизмов с использованием использованных коммерческих зондов. Благодаря разработанному алгоритму исчезает необходимость выбирать параметры сканирования для каждого образца, что существенно сокращает время проведения эксперимента. Разработанный алгоритм

может быть использован для адаптации параметров сканирования с использованием любых кантилеверов в лабораториях, использующих методы сканирующей зондовой микроскопии.

Таблица 1. Значения оптимальных параметров сканирования микроорганизмов в режимах прерывистого и непрерывного контакта.

		Amplitude, нм		Phase, °		Frequency, Гц		FB Gain, нм		Set Point, В	
		Прерыв- истый	Непре- рывный								
Значение параметра	min	10	1	0	0	0,1		0,3		1	1
	max	50	7	360	360	3		4		20	20
Шаг изменения параметра		5	0,5	10	10	0,1		0,1		1	0,5
Оптимальное значение параметра сканирования	Грам-положительные	20-25	2,5-3	250-330	250-330	0,5-0,7		0,6-1,2		9-19	2,5-7,5
	Грам-отрицательные	20-25	2,5-3	260-320	260-320	0,5-0,8		0,7-1,1		9-14	3-7
	Сообщество (био пленка) грамположительных микроорганизмов	20-25	2,5-3	250-280	250-290	0,5-0,6		1-1,2		12-14	2,5-7,5
	Сообщество (био пленка) грамотрицательных микроорганизмов	20-25	2,5-3	250-290	250-280	0,4-0,5		0,4-1,1		12-19	3-7

Качественная визуализация микробиологических объектов исследования способствует более глубокому изучению поверхностных структур бактерий, которые представляют определенный интерес при решении вопросов диагностики инфекционных болезней, биотехнологии, вакцинопрофилактики. В связи с этим, для повышения качества изображений, получаемых методом атомно-силовой микроскопии, нами впервые предложена методика обработки изображений с использованием модуля **Image Analysis**, которая позволяет получить объединенное изображение более высокого качества и содержащего полную информацию об образце. Эта методика может быть применена при исследовании материала с использованием режимов как прерывистого, так и непрерывного контакта. Разработанная методика, дает возможность четкого, высококонтрастного представления результатов с воспроизводимыми данными и высоким пространственным разрешением.

Разработанный алгоритм исследования микроорганизмов представлен в методическом документе (Методические рекомендации «Оптимизация параметров исследования микроорганизмов методом атомно-силовой микроскопии», утвержденными Ученым Советом и директором РосНИПЧИ «Микроб») может быть использован при выполнении научных исследований и практической деятельности в лабораториях, использующих методы атомно-силовой микроскопии.

В **четвертой** главе обоснован выбор метода фиксации для оценки морфологии и ультраструктуры бактериальных клеток. Нами было проверено влияние денатурирующих и аддитивных фиксаторов на морфологию и ультраструктуру бактериальных клеток с целью выбора оптимальных методов для полноценного исследования микроорганизмов с помощью АСМ. В качестве денатурирующего фиксатора оценивали различные концентрации этилового спирта, а влияние на микроорганизм выявляли по ряду количественных показателей. Использовали величину отношения ширина/высота - индекс I , который отражает защиту формы бактериальной клетки, а для сравнительной оценки нами был введен

коэффициент K , представляющий собой отношение $\frac{I_{\text{контроль}}}{I_{\text{эксперимент}}}$, при $K=1$ влияние фиксатора отсутствует. Поскольку штамм *E.coli M-17* составляет микрофлору кишечника человека, то в качестве контроля выступали клетки микроорганизмов, не подвергшихся действию различных методов фиксации.

Кроме того, оценивали шероховатость и адгезивные свойства бактериальной поверхности. Представленные нами данные показали, что денатурирующие фиксаторы в низких концентрациях, при которых не происходит глубоких изменений бактериальной клетки, обладают слишком низкой силой адгезии к поверхности подложки. Высокие концентрации

спирта с одной стороны способствуют высокой адгезии бактерий к подложке, что при световой микроскопии является положительным качеством, но для методов АСМ этот тип фиксации нарушает морфологию микробной клетки и препятствует исследованию ее ультраструктуры. Полученные результаты согласуются с данными зарубежных исследователей, которые отмечают, что фиксация спиртами способна разрушать липиды, формировать обширные поры в клетке и повреждать поверхностные макромолекулы бактериальной клетки.

Оценка влияния глутарового альдегида, как аддитивного фиксатора показало, что использование 2,5% раствора для фиксации не образующих споры микроорганизмов приводит к минимальному нарушению клеточной поверхности и полному сохранению ультраструктуры клеточной поверхности, такие как пили, жгутики и другие структуры.

Для бактерий образующих споры, учитывая тот факт, что в процессе выращивания микроба более 24 ч параллельно идет и процесс спорообразования у стареющих клеток, наиболее приемлема 5% концентрация глутарового альдегида, которая препятствует в последующем прорастанию спор и нежелательному обсеменению окружающей среды. Проведенные исследования показали незначительные изменения оцениваемых показателей при сравнении двух концентраций глутарового альдегида, но более высокие адгезирующие свойства последнего.

Полученные результаты исследований были учтены при составлении методического документа федерального уровня (МУ «Организация работы лабораторий, использующих методы электронной и атомно-силовой микроскопии при исследовании культур микроорганизмов I-IV групп патогенности»), утвержденных главным государственным санитарным врачом Российской Федерации, Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации.

В **пятой** главе разработан алгоритм, методика обработки изображений и выбранные методы фиксации использовали в микробиологических исследованиях с помощью комплекса методов атомно-силовой микроскопии.

Согласно литературным данным, образованию биопленки могут способствовать различные неблагоприятные для микроба факторы, например, действие антибиотиков, кислотные стрессы, температура и другие. Нами для изучения биофизических параметров биопленки микроорганизмов были изучены некоторые факторы, способствующие ее образованию.

При определении чувствительности *E.coli* к антибиотику широкого спектра действия Цефазолин-АКОС, который относится к группе цефалоспоринов и механизм его действия

связан с повреждением клеточной стенки бактерий, применяли концентрации препарата от 10 до 50 мкг/мл. После выращивания в среде с антибиотиком для оценки структурных изменений клеточной поверхности бактерий использовали три основных показателя: индекс I, отражающий защиту формы бактериальной клетки, величину RMS (шероховатость) и F - силу адгезии. Результаты исследований показали гетерогенность морфологических, геометрических и механических свойств популяции микроорганизмов в зависимости от дозы препарата. Процент клеток с выраженными нарушениями клеточной поверхности возрастал с увеличением дозы препарата и достигал 68%. Значения показателя RMS изменялись в зависимости от дозы и времени воздействия, и возрастали с повышением дозы антибиотика по сравнению с контролем в 3,4-7,3 раза. Тем не менее, глубоких повреждений клеток, приводящих к полному их разрушению, проверенные дозы антибиотика не вызывали.

Наиболее важным является показатель F - сила адгезии, так как благодаря адгезии к различным поверхностям микроорганизмы способны формировать биопленки. Этот показатель имел тенденцию, как к возрастанию, так и к снижению в зависимости от дозы антибиотика и времени экспозиции (рисунок 1). При концентрации антибиотика 40 и 50 мкг/мл уже через 1 ч наблюдали в отдельных местах образование прочно соединенных между собой клеток микроба (микроколонии), вокруг которых отмечали появление внеклеточного материала (элементы матрикса биопленки). Эти две дозы были нами отобраны для получения биопленки *E.coli* и *S. aureus*.

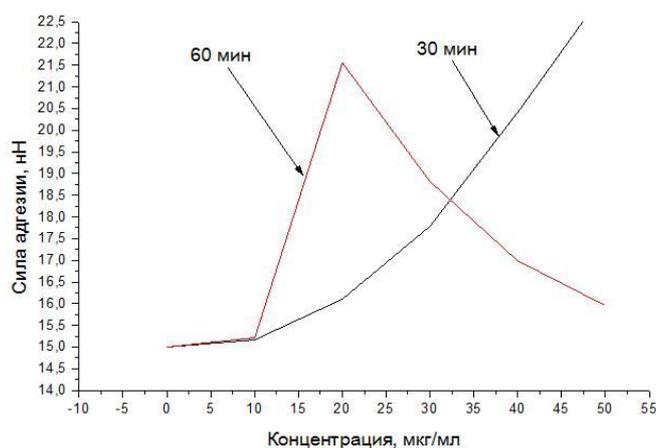


Рисунок 1. Динамика изменения силы адгезии *E.coli* под действием антибиотика.

Для исследования влияния кислотного и «щелочного» стресса на образование биопленки *E.coli* использовали растворы 0,1 М соляной кислоты и 2% гидрокарбоната натрия, которые при добавлении в экспериментальную среду изменяли значения рН от 1,05 до 9,43. В более

щелочной среде наблюдали выраженные изменения морфологии клетки, возрастала их ширина и высота, что отразилось на изменении индекса I. От 44,2 до 38,9% клеток приобретали укороченную, округлую форму с несколько выпуклой серединой.

При значениях pH 1,5-1,05 размеры клеток изменялись в меньшей степени, и форма оставалась прежней. В наших экспериментах не наблюдали существенных изменений силы адгезии и признаков образования элементов биопленки. Однако, по мнению ряда авторов низкие значения pH среды могут существенно влиять на жизнеспособность микробных клеток, адгезию и их гидрофобность. Эти показатели, по-видимому, важны на начальном этапе формирования биопленки.

Следующим этапом нашей работы было получение биопленки микроорганизмов и изучение ее биофизических характеристик (шероховатости, силы адгезии к подложке) с помощью методов атомно-силовой микроскопии. При выполнении исследований микроорганизмы *E.coli M-17* и *S. aureus A-100* выращивали в LB бульоне с добавлением 50 мкг/мл антибиотика на поверхности круглого покровного стекла, помещенного в чашки Петри в течение 24ч при температуре 37⁰С.

Для исследования начальных этапов формирования биопленок грамположительных (*S.aureus*) и грамотрицательных (*E.coli*) микроорганизмов формировали набор изображений на основе комплексного подхода, включающего три метода режима прерывистого контакта, и методов постоянной силы, латеральных сил и модуляции силы, АСМ спектроскопии режима непрерывного контакта, с этапом совмещения изображений.

Полуконтактный метод и метод постоянной силы АСМ были использованы для получения дву- и трехмерных топографических изображений бактерий, а также определения их физических и геометрических параметров (средняя арифметическая и среднеквадратичная шероховатости, индекс I, сила адгезии).

Методами рассогласования и латеральных сил были выявлены более тонкие детали ультраструктуры клеток микроорганизмов и начального этапа формирования биопленок – флагелла (пили и жгутики у *E.coli*), ЭПС.

Методами отображения фазы и модуляции силы была проведена регистрация изменения амплитуды и сдвиг фазы колебаний кантилевера, а также распределение адгезивности микроорганизмов к поверхности стекла. Эти методы позволили различить области с различной вязкостью, что проявлялось в изменении фазы колебаний зонда

Полученные данные свидетельствовали о неравномерном распределении клеток в сообществе (моно- или мультислой), а также наличия пептидогликана на клеточной поверхности (рисунок 2). Экзополисахарид (ЭПС) формировался не только на поверхности

бактерий, но и вокруг них - у *S.aureus* ЭПС располагался на поверхности бактерий, у *E.coli* - около бактерий.

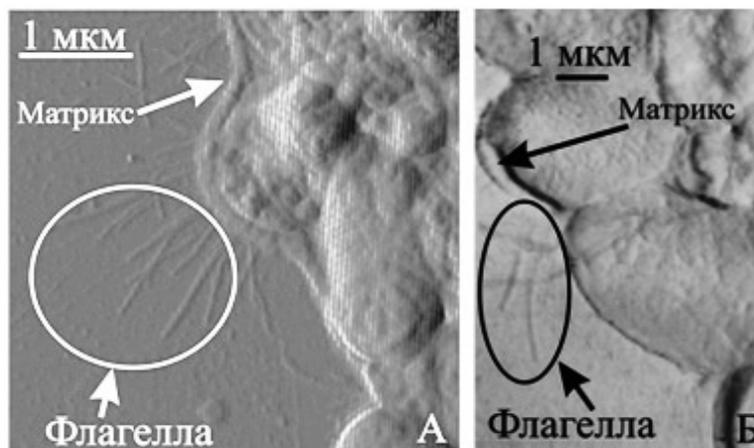


Рисунок 2. АСМ изображения *E.coli*, полученные методом рассогласования (А) и методом латеральных сил (Б).

Такое расположение ЭПС способствовало снижению силы отталкивания иглы кантилевера от бактерий и повышало связывание зонда с поверхностью микроорганизмов. Исследования показали повышенную вязкость ЭПС по сравнению с бактериями, что проявилось в увеличении адгезивности и фазы колебаний кантилевера. Полученные данные согласуются с результатами других авторов, изучающих аналогичные процессы.

При оценке влияния поверхностных белковых структур микроорганизмов на альтернативные подложки с целью оценки сорбционной емкости хитозана как подложки в иммунологии, в качестве примера использовали мембраны из хитозана, приготовленные из низкомолекулярного порошкообразного хитозана молекулярной массой 200 кДа. Изучали изменения мембран из хитозана, вызванные нанесением на них видоспецифического антигена чумного микроба – капсульного антигена (фракцией I - FI), а также специфических антител к нему.

Морфология нативных мембран характеризовалась отсутствием пор. Данные, полученные комплексом методов: отображения рельефа, рассогласования и отображения фазы, не отразили существенных топографических и гетерогенных различий поверхности нативных мембран хитозана. Методом латеральных сил не выявлено областей с высоким коэффициентом трения.

При последующем нанесении на мембраны из хитозана различных белковых структур, на поверхности препарата происходит формирование 20-25 пор на 1 мм^2 , диаметром около 10

нм. Эти поры хаотично расположены на поверхности мембраны из хитозана (рисунок 3). Вероятно, благодаря этому, формируются области с более высокой силой трения (100-160 пН) и повышенной адгезией (до 17,6 нН). Применение метода латеральных сил атомно-силовой микроскопии позволяет выявлять комплексы антиген-антитело, размером 0,35-0,5 мкм.

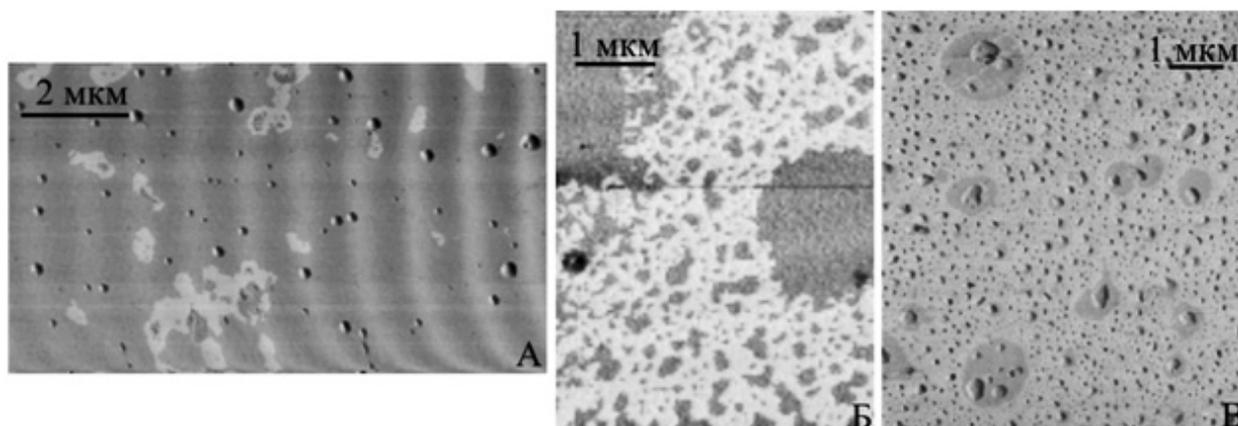


Рисунок 3. АСМ изображения модифицированных мембран из хитозана. Метод латеральных сил. А – F1; Б – антитела; В – взаимодействие антиген-антитело.

Таким образом, использование разработанных алгоритмов и методических подходов позволило ускорить процессы подготовки материала и прибора к биофизическим исследованиям микроорганизмов, улучшить визуализацию изучаемых объектов за счет их использования **Image Analysis**, повысить качество получаемых изображений, внедрение комплексного подхода для исследования формирования биопленок бактериями способствовало более глубокому пониманию этих процессов.

ВЫВОДЫ

1. Разработан алгоритм определения оптимальных диапазонов основных параметров сканирования микроорганизмов методом атомно-силовой микроскопии, а также методика обработки изображений с использованием модуля **Image Analysis**, которые представлены в методическом документе «Оптимизация параметров исследования микроорганизмов методом атомно-силовой микроскопии», утвержденном Ученым Советом и директором РосНИПЧИ «Микроб» и используется при выполнении научных исследований;

2. Проведен анализ влияния различных методов фиксации на бактериальные клетки и показана возможность использования аддитивной (неинвазивной) фиксации для изучения микробиологических объектов. Полученные результаты исследований были учтены при составлении методического документа федерального уровня (МУ «Организация работы лабораторий, использующих методы электронной и атомно-силовой микроскопии при исследовании культур микроорганизмов I-IV групп патогенности»), утвержденных главным государственным санитарным врачом Российской Федерации, Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации;

3. С использованием комплекса методов АСМ визуализирован характер влияния кислотного и «щелочного» стресса на морфологические, геометрические, механические свойства клеток *E.coli*. Показано фиксирующее действие низких значений рН среды (1,5) и гетерогенные изменения структуры микробной клетки *E.coli* при выраженном щелочном значении среды;

4. Методом АСМ зафиксирована гетерогенность морфологических и механических свойств клеток в популяции *E.coli* при воздействии антибиотика Цефазолин-АКОС. Зарегистрировано образование биопленки под влиянием небольших доз антибиотика;

5. Выявлены различия в биофизических показателях биопленки микроорганизмов с использованием комплексного подхода на основе режимов прерывистого и непрерывного контакта АСМ, позволяющего охарактеризовать бактерии, участвующие в начальных этапах формирования биопленок и выявить более мелкие их структуры;

6. Оценено влияние поверхностных белковых структур микроорганизмов на сорбционную емкость альтернативных подложек – мембран из хитозана. Показано, что активность мембран из хитозана определяется наличием пор на его поверхности, которые формируются при модификации белковыми структурами, наличием областей с различным коэффициентом трения, увеличением силы адгезии.

Выражаю искреннюю и глубокую благодарность доктору физико-математических наук, профессору Максимовой Ирине Леонидовне, безвременно ушедшей от нас, за огромную всестороннюю поддержку и помощь, благодаря которой стало возможным проведение данной экспериментальной работы, а также заведующего кафедрой оптики и биофотоники, научного руководителя, профессора, доктора физико-математических наук Тучина Валерия Викторовича за всестороннюю поддержку при выполнении данной работы.

Хочу также поблагодарить сотрудников отдела диагностики инфекционных болезней РосНИПЧИ «Микроб», доктора биологических наук, профессора, главного научного сотрудника Коннова Николая Павловича, кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника, Бугоркову Татьяну Васильевну, кандидата биологических наук, научного сотрудника Кузнецова Олега Святославовича за огромную помощь при проведении эксперимента и интерпретации полученных результатов.

СПИСОК РАБОТ, ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Ерохин, П.С. Комплексный подход к изучению биопленок микроорганизмов методом атомно-силовой микроскопии / П.С. Ерохин, О.С. Кузнецов, Н.П. Коннов, Н.А. Видяева, Д.В. Уткин // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия физика. – 2012. - Т. 12. - Вып. 1. - С. 43-47.

2. Ерохин, П.С. Современные возможности изучения ультраструктуры клеток микроорганизмов методом сканирующей зондовой микроскопии / П.С. Ерохин, Д.В. Уткин, Т.В. Бугоркова, О.С. Кузнецов, Н.А. Осина // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия физика. – 2012. - Т. 12. - Вып. 1. - С. 33-37.

3. Уткин, Д.В. Разработка методических подходов изучения возбудителей особо опасных инфекционных болезней с использованием атомно-силовой микроскопии / Д.В. Уткин, О.С. Кузнецов, П.С. Ерохин, А.Н. Спицын, О.А. Волох, Н.А. Осина // Проблемы особо опасных инфекций. – 2012. – Вып. 2(112). – С. 62-64.

4. Ерохин, П.С. Применение атомно-силовой микроскопии для определения воздействия антибактериальных препаратов на микробную клетку (на примере *E.coli* и цефлоспоринов I поколения) / П.С. Ерохин, Д.В. Уткин, О.С. Кузнецов, Н.П. Коннов, Н.А. Осина // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия физика. – 2013. - Т. 13. - Вып. 2. - С. 28-33.

5. Уткин, Д.В. Направления развития диагностики инфекционных болезней с использованием методов нанобиотехнологий / Д.В. Уткин, М.Н. Киреев, В.Е. Куклев, П.С. Ерохин, Н.А. Шарапова, Н.П. Коннов, В.В. Кутырев // Нанотехника. – 2013 г. – № 4(36). - С. 56-57.

6. Ерохин, П.С. Влияние различных способов фиксации на морфологию клеток холерного вибриона при проведении исследований с применением сканирующей зондовой микроскопии / П.С. Ерохин, Д.В. Уткин, О.С. Кузнецов, С.А. Портенко // Материалы РКЭМ – XXIII – Черноголовка, 2010, с. 355.

7. Ерохин, П.С. Исследование чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам контактным методом атомно-силовой микроскопии на примере кишечной палочки / П.С. Ерохин // Мат. ежегодной Всероссийской научной школы-семинара «Методы

компьютерной диагностики в биологии и медицине» - Саратов, 2011. – С. 156-159.

8. Ерохин, П.С. Морфологическая и спектральная характеристика мембран из хитозана / П.С. Ерохин, М.Н. Киреев, Н.П. Коннов, Д.В. Уткин // Материалы международной молодежной научной школы «Современные биоинженерные и ядерно-физические технологии в медицине» – Саратов, 2012. – С. 35-39.

9. Ерохин П.С. Оптимизация параметров исследования микроорганизмов методом атомно-силовой микроскопии / П.С. Ерохин, Н.П. Коннов, О.С. Кузнецов, Д.В.Уткин // Тезисы докладов 25 международной научной конференции «Математические методы в технике и технологиях» - Саратов, Москва, Харьков, 2012. - Т. 4. – С.123-125.

10. Киреев, М.Н. Перспективы использования искусственных и природных наноматериалов и наномаркеров при разработке диагностических тест-систем / М.Н. Киреев, Д.В. Уткин, Н.А. Шарапова, П.С. Ерохин, С.А. Щербакова // Материалы X съезда ВНПОЭМП – Москва, 2012. – Т. 2. - № 1-2. – С. 278.

11. Киреев, М.Н. Экологически чистые, биодегралируемые природные полимеры: перспективы использования в биотехнологии / М.Н., Киреев, Т.А. Полунина, Д.В. Уткин, П.С. Ерохин, И.А. Касьян, М.В. Овчинникова, Т.В. Аленкина, Т.М. Тараненко // Материалы научно-практической конференции с международным участием «Окружающая среда и здоровье» – Саратов, 2012. – С. 82-83.

12. Киреев, М.Н. Природные биополимеры – перспективные компоненты МИБП / М.Н. Киреев, Т.А. Полунина, Т.А. Храмченкова, Д.В. Уткин, П.С. Ерохин, М.В. Овчинникова, Т.В. Аленкина, Т.М. Тараненко, А.К. Никифоров // Материалы XI межгосударственной научно-практической конференции «Современные технологии в совершенствовании мер предупреждения и ответных действий на чрезвычайные ситуации в области общественного здравоохранения санитарно-эпидемиологического характера» – Саратов, 2012. – С. 108-109.

13. Уткин, Д.В. Разработка новых инструментальных и методических подходов к индикации и идентификации патогенных биологических объектов с применением физических методов анализа / Д.В. Уткин, О.С. Кузнецов, А.Н. Спицын, П.С. Ерохин, Н.П. Коннов, В.Г. Германчук, Д.А. Щербаков, М.Н. Киреев, Н.А. Осина, С.А. Щербакова, В.В. Кутырев // Материалы X съезда ВНПОЭМП – Москва, 2012. – Т. 2. - № 1-2. - С. 89-90.

14. Овчинникова, М.В. Визуализация специфической модификации хитозана с помощью атомно-силовой микроскопии / М.В. Овчинникова, Т.В. Аленкина, О.С. Кузнецов, П.С. Ерохин, А.К. Никифоров // Материалы совещания специалистов Роспотребнадзора «Холера и патогенные для человека» – Ростов-на-Дону, 2013. – Вып. 26. – С. 238-241.

15. Уткин, Д.В. Применение атомно-силовой микроскопии в лабораторной диагностике

особо опасных инфекций / Д.В. Уткин, О.С. Кузнецов, П.С. Ерохин, Н.А. Осина, С.А. Щербакова // Тезисы докладов XVIII Российского симпозиума по электронной микроскопии и аналитическим методам исследования твердых тел – Черногоровка, 2013. – С. 502-503.

16. Коннов, Н.П. Физические показатели силовых характеристик бактерий кишечной палочки при воздействии различных факторов биотической и абиотической природы методом атомно-силовой микроскопии / Н.П. Коннов, П.С. Ерохин, О.С. Кузнецов, Д.В. Уткин // Материалы Всероссийского семинара памяти профессора Ю.П. Волкова «Современные проблемы биофизики, генетики, электроники и приборостроения» - Саратов, 2013. - С. 26-27.

17. Киреев, М.Н. Комплекс методов атомно-силовой микроскопии для характеристики нативного и модифицированного антителами хитозана / М.Н. Киреев, П.С. Ерохин, Д.В. Уткин, О.С. Кузнецов, Н.П. Коннов // Тезисы докладов XVIII Российского симпозиума по электронной микроскопии и аналитическим методам исследования твердых тел – Черногоровка, 2013. – С. 464-465.

18. Ерохин, П.С. Повышение качества АСМ изображений биопрепаратов с использованием модуля Image Analysis / П.С. Ерохин, Н.П. Коннов, О.С. Кузнецов, Д.В. Уткин // Материалы 26 международной научной конференции «Математические методы в технике и технологиях» – Саратов, Нижний Новгород, 2013. – Т. 8 – С. 160-162.

19. Киреев, М.Н. Природные биodeградируемые полимеры как активные компоненты изделий медицинского назначения / М.Н. Киреев, М.В. Овчинникова, Т.В. Аленкина, Д.В. Уткин, П.С. Ерохин, Т.А. Полунина, И.А. Касьян, А.К. Никифоров // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Инновационные технологии в противоэпидемической защите населения» – Нижний Новгород, 2014 г. – С. 241-243.

20. Кузнецов, О.С. Обработка и анализ АСМ изображений микроорганизмов с помощью программного модуля Image Analysis (группа методов Grain Analysis) / О.С. Кузнецов, Д.В. Уткин, П.С. Ерохин, Н.П. Коннов, В.Е. Куклев // Мат. РКЭМ – XXV – Черногоровка, 2014 г. – Т. 2. - С. 602-603.

21. Ерохин, П.С. Дифференциация капсульных и бескапсульных штаммов микроорганизмов методом сканирующей зондовой микроскопии / П.С. Ерохин, Д.В. Уткин, О.С. Кузнецов, Е.М. Кузнецова, О.А. Волох // Мат. РКЭМ – XXV – Черногоровка, 2014 г. – Т. 2. - С. 578-579.

22. Уткин, Д.В. Математическая обработка АСМ изображений клеток микроорганизмов / Д.В. Уткин, П.С. Ерохин, О.С. Кузнецов, В.Е. Куклев // Материалы международной конференции «Современные достижения бионаноскопии» – Москва, 2014 г. - С. 26-27.

Ерохин Павел Сергеевич

**АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ КАК ИНСТРУМЕНТ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БАКТЕРИЙ К ФАКТОРАМ БИОТИЧЕСКОЙ
И АБИОТИЧЕСКОЙ ПРИРОДЫ**

03.01.02 – биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

Подписано в печать 27.02.15. Формат 60x84/16. Бумага типографская офсет.
Гарнитура Times New Roman. Печ. л. 1.0
Тираж 100. Заказ № 088.

Отпечатано с готового оригинал-макета
Типография «Техно-Декор»,
Саратов, Московская, 160, тел.: 26-38-48,
sar-print.ru