



## Конкурс для школьников «Гениальные мысли» Автореферат проекта призера III степени

**Название работы – Метод параллельного расположения бактерий на подложке для повышения точности их исследования методами зондовой сканирующей микроскопии.**

**Автор – Банков Александр Александрович (8 класс, ГАОУ ТО "ФМШ", г. Тюмень).**

**Руководитель – Тарасов Олег Александрович, учитель технологии, ГАОУ ТО "ФМШ".**

### **Основная идея работы, цели, задачи**

*Цель:* разработать и практически реализовать воспроизводимый способ параллельного размещения бактерий на твердые подложки.

### *Задачи:*

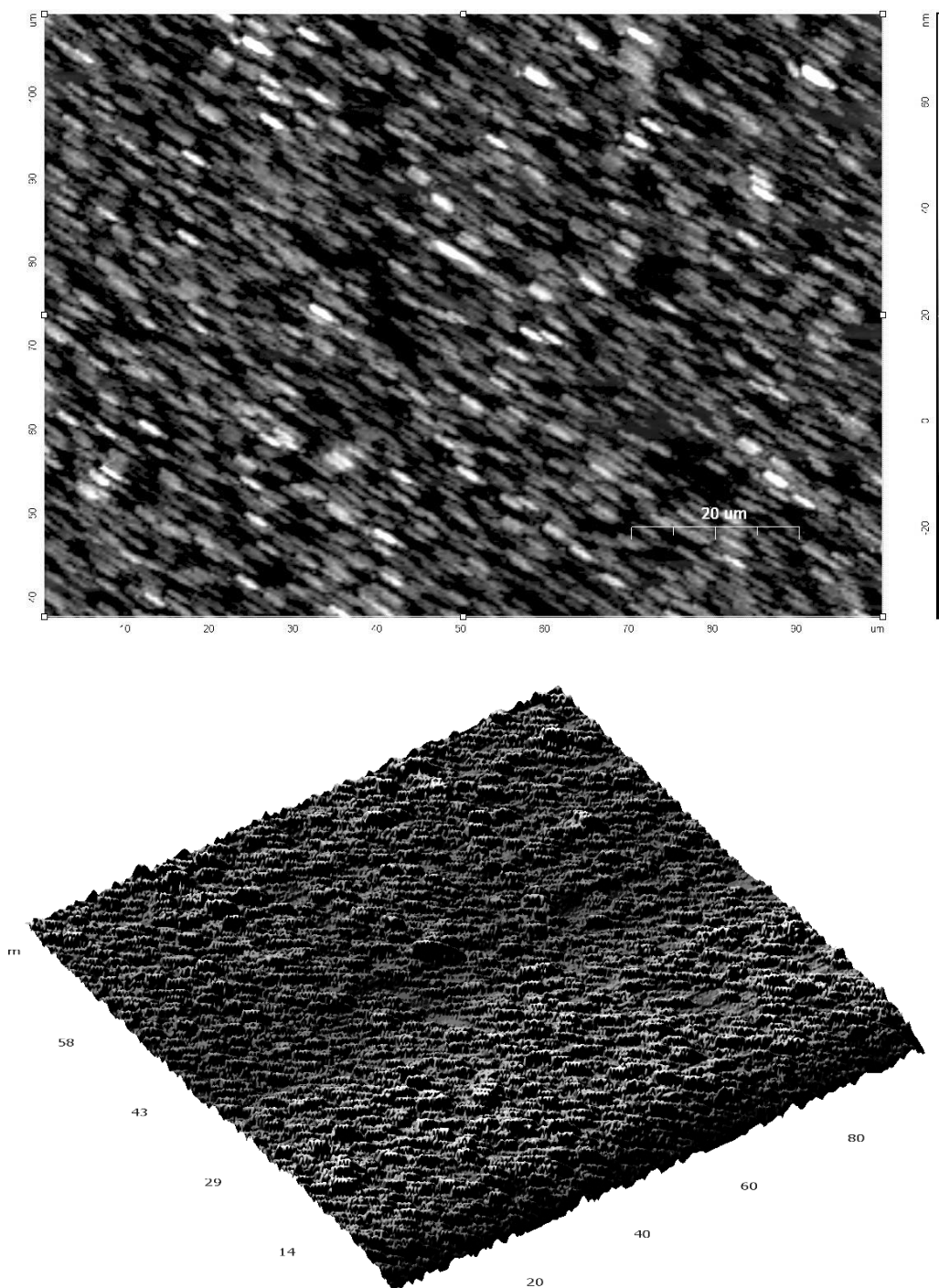
- Проанализировать источники литературы, касающиеся использования зондового сканирующего микроскопа (ЗСМ) для исследования бактерий.
- Ознакомиться с теоретическими основами зондовой микроскопии и приобрести навыки работы на Нанозьюкаторе-II.
- Провести экспериментальную апробацию предложенного способа параллельного размещения бактерий на подложке.
- Построить распределения бактерий по углам и длинам и предложить сферы применения нашего способа.
- 5) Оформить лабораторную работу по нано- и биотехнологии для обучения учеников нашей школы и других школ в соответствии с программой повышения качества физического образования в Тюменской области.

### **Основные результаты**

В наших экспериментах подложками для осаждения бактерий служили покровные стекла 18x18x0,018 мм, у которых с помощью ЗСМ Нанозьюкатор-2 (Зеленоград НТ-МДТ), работающего в полу-контактном режиме, был обнаружен синусоидальный рельеф с пространственным периодом 4 нм и высотой 3-4 нм, который возник, по-видимому, в процессе их изготовления, рис. 1.

В качестве бактерий использовали штамм *Bifidobacterium Longum* MC-42, а в качестве вязкого раствора для осаждения – исходный (не разбавленный) раствор жидкого пробиотика «Биовестин».

Покровные стекла обезжиривали 96 % этанолом медицинским (ООО СБИО, серия 30316). Затем стекла высушивали и помещали их по одному на дно стерильных пластиковых чашек Петри с крышкой диаметром 60 мм (Медполимер, СПб). Выливали в каждую чашку по одному флакону Биовестина, предварительно вынутому из холодильника и принявшему комнатную температуру. Закрывали чашки крышками и выдерживали раствор для осаждения бактерий в течение 20 минут. Затем промывали стекла дистиллированной водой, помещали их в новые чашки Петри, закрывали крышкой и оставляли их на сутки для высыхания.



*Рис.1 Бактерии на покровном стекле в 2D и 3D. Масштаб 100×72 мкм.*

Образцы прикрепляли на столик ЗСМ Наноэдюкатор-2 с помощью двухстороннего скотча и осуществляли их сканирование в полу-контактном режиме на воздухе в масштабе 100×100 мкм и ниже при частоте сканирования 0,07 Гц на линию, что при разрешении снимка 256×256 пикселей давало время сканирования 1 час. Рабочая точка обратной связи была установлена в 8 нА, как 80 % от максимальной амплитуды колебаний зонда, а коэффициент обратной связи был выбран равным 0,4. Направления сканирования было выбрано слева направо. Более медленное сканирование не добавляло качества изображению, а более быстрое приводило к появлению артефактов в виде вытягивания правых краев бактерий вследствие медленной работы обратной связи вертикального положения зонда. Увеличение же усиления обратной связи приводило к самовозбуждению зонда на резонансной частоте и появлению муара на изображении. В качестве зонда служила вольфрамовая проволока диаметром 300 мкм, заостренная путем отрезания.

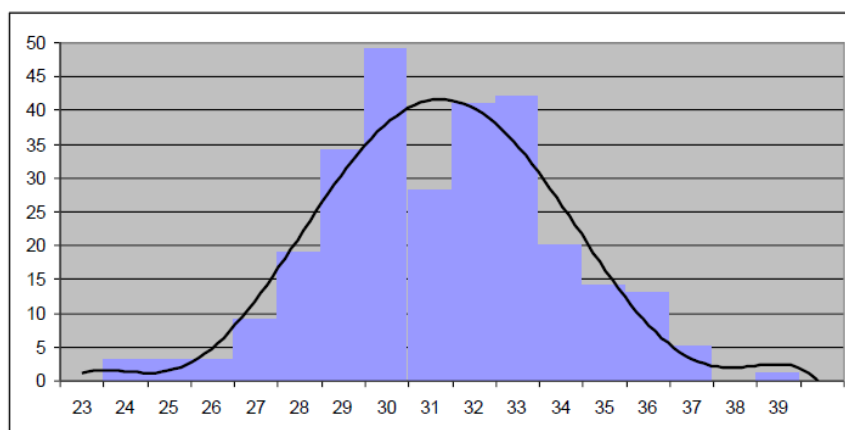
На всех образцах было получено параллельно расположению бактерий в поле зрения, рис. 1, соответствующее предварительно установленному параллельному расположению периодичности их рельефа, рис. 1. При этом, случаи перекрывания бактерий друг другом (когда одна бактерия лежала прямо на другой) носили единичный характер и могли быть практически полностью устранены уменьшением времени осаждения бактерий.

Тот факт, что большинство бактерий лежало на подложке, не перекрываясь друг с другом, связан с тем, что сила притяжения молекул мембраны бактерии к молекулам подложки из силикатного стекла существенно выше силы притяжения молекул мембран двух бактерий. Поэтому, если данное место подложки уже занято осевшей бактерией, то силы притяжения к этой бактерии другой бактерии, как правило, недостаточно для прикрепления последней. За счет подвижности второй бактерии (например, ее броуновского движения) она перемещается дальше, пока не коснется пустого участка подложки. В этом случае сила притяжения между мембраной и подложкой уже достаточна, чтобы прикрепить бактерию к подложке.

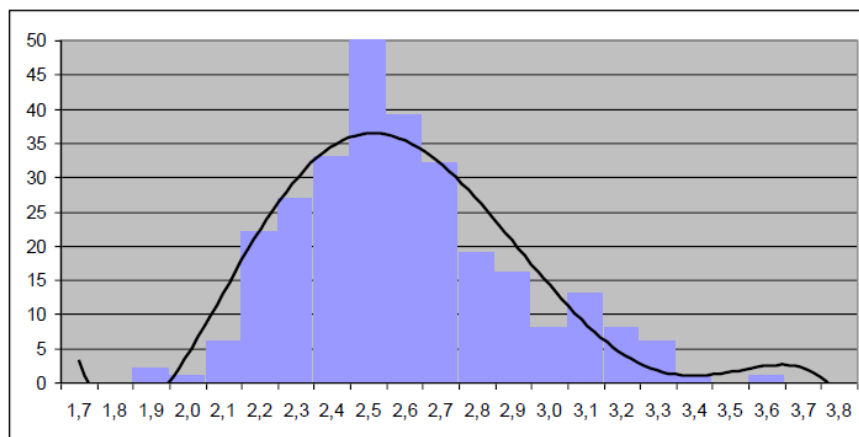
Только в случае, если на заданном участке подложки уже имеется сплошной слой прикрепившихся бактерий и доступ к подложке отсутствует, а раствор с бактериями еще находится на подложке, будет происходить прикрепление бактерий вторым слоем поверх первого, причем так, что параллельность расположения бактерий сохраняется. Это связано с тем, что сила притяжения бактерий друг к другу гораздо слабее, чем бактерий к подложке, и поэтому прикрепление бактерий возможно, если только одна бактерия коснулась другой, будучи параллельной и почти точно расположенной над ней (почти без сдвига вдоль оси). При непараллельном касании или параллельном касании без перекрытия осаждаемая бактерия в состоянии оторваться от уже прикрепленной на подложку. Эти рассуждения хорошо подтверждаются результатами сканирования, на которых видно, что прикрепляемые вторым слоем бактерии садятся на бактерии первого слоя практически точно одна на другую, рис. 1.

Для оценки степени параллельности расположения бактерий на подложке измеряли координаты противоположных точек вдоль длинной оси бактерий на изображениях образцов в программе Microsoft Paint 6, а затем в программе Microsoft Office Excel 2003 по этим данным рассчитывали углы поворота бактерий относительно оси абсцисс изображения.

Результаты измерений по 300 бактериям образца, показанного на рис. 2, приведены на рис. 3. Установили, что 90 % бактерий имеют угол, отличающийся от среднего не более чем на  $\pm 4^\circ$ , а 95 % – не более чем на  $\pm 5^\circ$ .



*Распределение бактерий (штук) по углу (град).*



*Распределение бактерий (штук) по длине (мкм).*

*Рис.2. Результаты по геометрии и расположению бактерий на подложке.*

Это более чем достаточно, чтобы устранить влияние разного направления сканирования зонда по отношению к оси бактерий на результаты определения их геометрических размеров.

Важно отметить и негауссов характер распределения бактерий по углам (провал на  $31^\circ$  и пики на  $30^\circ$  и  $33^\circ$ ), который говорит о том, что отклонение бактерий от среднего угла  $31^\circ$  не полностью случайно, а подчиняется некой закономерности. Данная закономерность, очевидно, связана с пространственной немонотонностью угла периодической структуры подложки. Мы использовали покровное стекло, у которого данный рельеф возник в процессе его изготовления. В дальнейшем планируем использовать в качестве подложек нарезные стеклянные и металлические дифракционные решетки, структура поверхности которых четко определена. Однако, предстоит еще выяснить, как будет влиять большая глубина рельефа решеток, сопоставимая с диаметром бактерий на их расположение на подложке.

Чтобы убедиться, что угол положения бактерий сохраняется и за пределами небольшого поля зрения (максимум  $100 \times 100$  мкм) сканирующего микроскопа, были просканированы 9 областей на одной подложке, центры которых были расположены в шахматном порядке и удалены по осям абсцисс и ординат на 2,5 мм друг от друга, рис. 3. Для этого, образец с бактериями, осажденными нашим методом, помещался на столик микроскопа при нулевом выведении его микрометрических винтов. Сканировали область подложки  $20 \times 20$  мкм с частотой 0,15 Гц на линию, что соответствовало времени сканирования области 30 минут. Все остальные настройки ЗСМ были теми же, что указаны выше. Затем смещали образец строго параллельно микрометрическими винтами микроскопа по одной и / или двум осям с шагом 0 и  $\pm 2,5$  мм (полный ход микрометров был равен 5 мм).

Результаты, приведенные в табл. 1, показывают, что параллельность расположения бактерий сохраняется на области подложки  $5 \times 5$  мм в пределах ошибки  $\pm 3,2^\circ$  от среднего значения в  $34,41^\circ$  по всем площадкам. Усреднение угла производили по 30-50 бактериям в поле зрения. При этом, хотя средние углы положения бактерий на 9 исследованных площадках близки, распределение углов является немонотонным и объясняется немонотонностью угла периодического рельефа подложки, что было отмечено еще при анализе рис. 3.



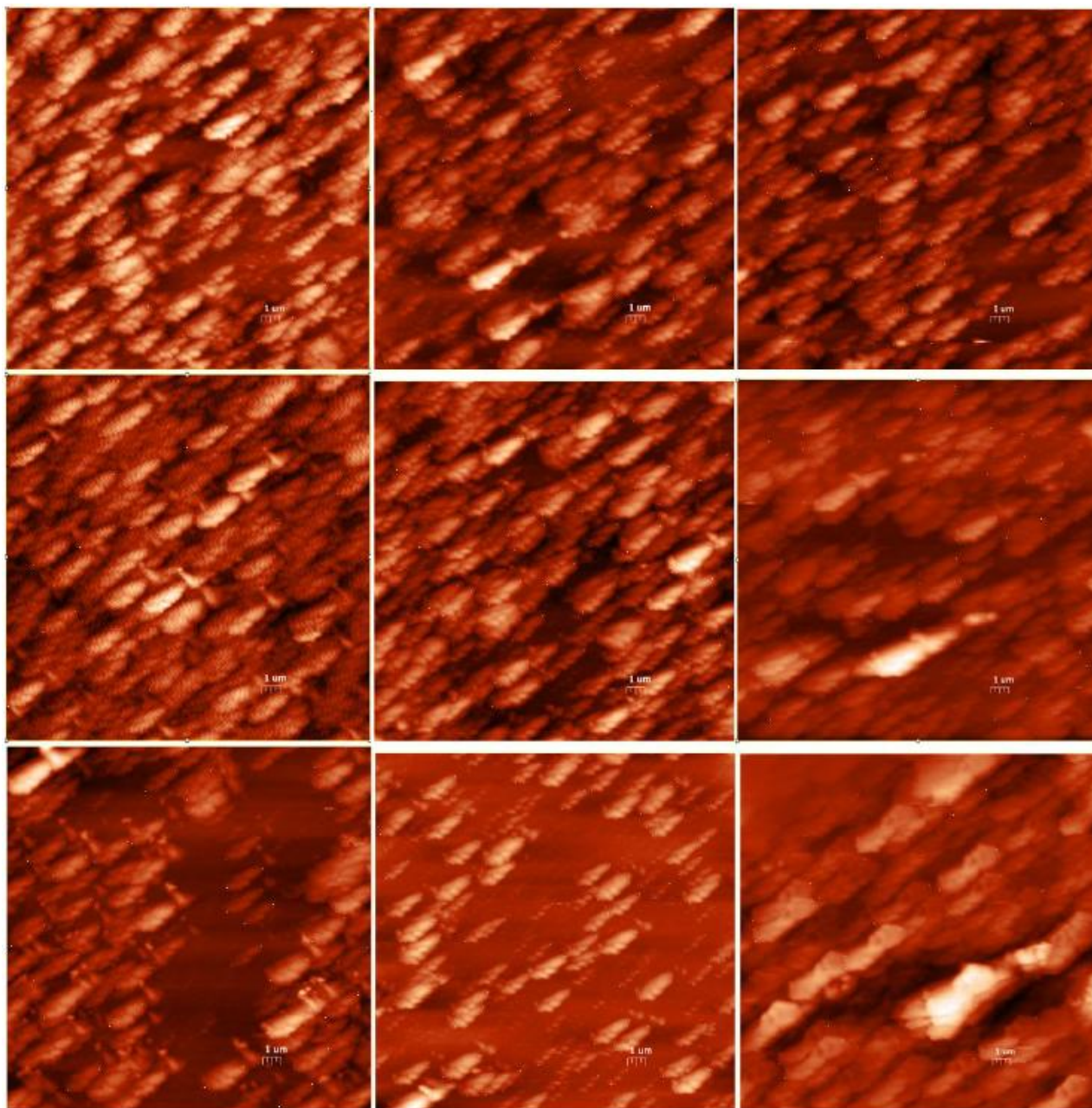


Рис. 3. Бактерии на покровном стекле в 2D. Масштаб 20×20 мкм.

Таблица. 1. Средние углы положения бактерий и доверительный интервал при доверительной вероятности 0,95 на 9 участках одной подложки.

Отсчеты микрометров микроскопа по двум осям, мм	Угол, град		
	- 2,5	0	+ 2,5
- 2,5	34,8 ± 1,7	34,4 ± 1,2	33,3 ± 1,3
0	32,4 ± 1,1	36,0 ± 1,5	31,3 ± 1,2
+ 2,5	32,8 ± 1,0	37,6 ± 1,4	37,1 ± 0,9

## **Выводы, заключение, перспективы**

1. Мы разработали способ параллельного расположения бактерий на твердые подложки. Экспериментальные исследования с зондовым сканирующим микроскопом показали, что 90 % бактерий имеют угол, отличающийся от среднего не более чем на  $\pm 4^\circ$ , а 95 % – не более чем на  $\pm 5^\circ$ .
2. Получены два свидетельства о государственной регистрации программ для ЭВМ: № 2017661512 «Определение длин бактерий по их изображениям в зондовый сканирующий микроскоп» и № 2017661513 «Определение углов расположения бактерий на подложке по отношению к направлению сканирования зондового микроскопа».
3. Готовятся заявка на изобретение «Способ параллельного расположения бактерий на подложки» и статья в реферативный журнал «Биотехнология» в раздел «Технология биопрепаратов».
4. Готовится методичка по лабораторной работе, демонстрирующий наш способ, для учащихся Физико-математической школы Тюменской области и студентов Тюменского госуниверситета направлений «Нанотехнологии» и «Биология».

## **Список цитированных источников**

1. Микробиология учебник - Воробьев А.В., Быков А.С., Пашков Е.П., 2003.
2. И. В. Кухтевич, М. В. Жуков, В. И. Чубинский-Надеждин, А. С. Букатин, А. А. Евстапов. Фиксация бактерий e.coli на подложке для измерений в жидкости методом атомно-силовой микроскопии // Научное приборостроение, 2012, том 22, № 4, с. 56–61.
3. Effects and applications of sub-lethalultrasound, electroporation and UV radiations in bioprocessing. Article in Annals of Microbiology · October 2012
4. СЗМ NanoEducator. Руководство пользователя. [http://nano.donstu.ru/labrab/szm\\_nanoeducator.\\_rukovodstvo\\_polzovatelya\\_mac\\_os\\_.pdf](http://nano.donstu.ru/labrab/szm_nanoeducator._rukovodstvo_polzovatelya_mac_os_.pdf)
5. Манипуляция биологическими микрообъектами оптическими пинцетами различных типов Афанасьев К.Н., Волостников В.Г., Воронцов Е.Н., Коробцов А.В., Котова С.П., Лосевский Н.Н.
6. Зондовая Фотонно-стимулированная нанолитография структур на основе пленки титана Агеев О.А., Коноплев Б.Г., Поляков В.В., Светличный А.М., Смирнов В.А.
7. Воздействие антибиотиков и фунгицидов на цианобактерию Nostos Punctiforme hariot сопутствующие организации Егупова Е.Ю., Багмет В.Б., Абдуллин Ш.Р.