



НОВЫЙ ВЗГЛЯД НА ОПТИЧЕСКУЮ МИКРОСКОПИЮ БАКТЕРИЙ СКВОЗЬ МИКРОЛИНЗЫ

NEW LOOK ON THE OPTICAL MICROSCOPY OF BACTERIA THROUGH MICROLENS

И.В.Яминский^{1,2,3}, д.ф.-м.н., профессор МГУ имени М.В.Ломоносова, физический и химический факультеты, генеральный директор Центра перспективных технологий, директор Энергоэффективных технологий, (ORCID: 0000-0001-8731-3947), А.И.Ахметова^{1,2,3}, инженер НИИ ФХБ имени А.Н.Белозерского МГУ, ведущий специалист Центра перспективных технологий и Энергоэффективных технологий (ORCID: 0000-0002-5115-8030), С.А.Сенотрусова¹, студент, (ORCID: 0000-0003-0960-8920) / yaminskiy@nanoscopy.ru
I.V.Yaminskiy^{1,2,3}, *Doct. of Sci. (Physics and Mathematics), Prof. of Lomonosov Moscow State University, Physical and Chemical departments, Director of Advanced Technologies Center, A.I.Akhmetova^{1,2,3}, Engineer of A.N.Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Leading Specialist of Advanced Technologies Center and of Energy Efficient Technologies, S.A.Senotrusova¹, student*

DOI: 10.22184/1993-8578.2021.14.6.336.340

Получено: 11.09.2021 г.

Выполнение высокочувствительных и селективных измерений бактериальных клеток в реальном времени остается сложной задачей [1]. Стандартные методы идентификации организмов, такие как тесты антитело-антиген, тесты на С-реактивный белок или прокальцитонин очень чувствительны, но в то же время и довольно дороги. Более доступные методы, такие как выращивание на чашке с агаром, могут обеспечить необходимую чувствительность, избирательность и надежность, но обычно требуют минимум 24 ч для получения окончательных результатов, что может быть критическим для некоторых случаев заболеваний. Следовательно, для борьбы с появлением устойчивых к лекарствам штаммов бактерий необходимы недорогие и простые методы для быстрого обнаружения и исследования бактерий.

Highly sensitive and selective measurements of bacteria cells in real-time mode remain a complicated task [1]. Standard methods for identifying the organisms, such as antibody antigen tests, tests on C-reactive protein or procalcitonin are very sensitive, but still quite expensive yet. Readily available methods, for example, growing in agar, can provide the necessary sensitivity, selectivity and reliability, but usually require at least 24 hours for obtaining the results, which can be critical for some disease cases. Hence, in order to exclude the advent of new drug-resistant strains of bacteria, it is necessary to develop new simple and cheap methods for quickly detecting and studying bacteria.

ВВЕДЕНИЕ

Атомно-силовая микроскопия – традиционный инструмент для исследования морфологии бактериальных клеток, позволяющий детально изучить строение и адгезионную способность поверхностной мембраны клетки, оценить

адсорбцию на различных подложках и воздействие лекарственных препаратов. Помимо этого, АСМ может выступать в качестве сенсора для определения метаболизма бактерии в различных условиях среды и под воздействием реагентов.

¹ МГУ имени М.В.Ломоносова, физический и химический факультеты, НИИ ФХБ имени А.Н.Белозерского МГУ Москва, Россия / Physical and Chemical departments, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia.

² ООО НПП "Центр перспективных технологий", Москва, Россия / Advanced Technologies Center, Moscow, Russia.

³ ООО "Энергоэффективные технологии", Москва, Россия / Energy Efficient Technologies, Moscow, Russia.

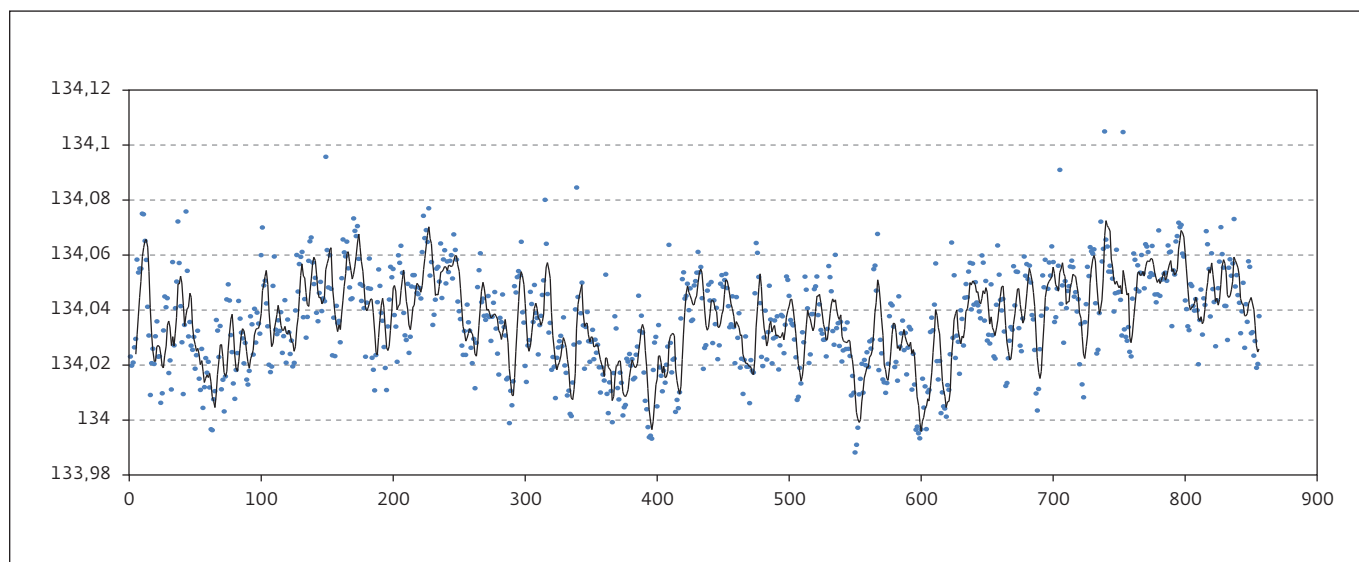


Рис.1. Контрольное измерение колебаний пьезокерамического диска, характерный диапазон частот изменяется в пределах 0,06–0,08 кГц. По оси абсцисс – количество измерений, по оси ординат – значения резонансной частоты

Fig.1. Control measurement of the piezoceramic disk oscillations, the specific frequency range is 0.06–0.08 kHz. X axis – the number of measurements, Y axis – the resonance frequency values

Данный метод основан на том принципе, что молекулярное распознавание на поверхности микромеханической системы (например, кантилевера) приводит к изгибу (отклонению) на несколько нанометров (статический режим) или к изменению резонансной частоты (динамический режим) [3–5]. Эти системы обладают уникальными свойствами, поскольку позволяют проводить исследование без меток и имеют высокую потенциальную чувствительность. Было показано, что низкочастотные колебания кантилеверов атомно-силовой микроскопии можно использовать для характеристики бактерий, быстрого тестирования их чувствительности к антибиотикам и определения устойчивости в течение

нескольких минут [6, 7]. На практике бактерии помещают на кантилевер и детектируют колебания, которые напрямую коррелируют с метаболизмом клеток. Было продемонстрировано, что движение кантилевера обусловлено движением мембран в живых клетках и исчезает в случае смерти бактерии [8]. Характерный диапазон колебаний бактериальных клеток *E.coli* 0,01–1 кГц [9].

Многие биологические процессы, происходящие внутри живых бактерий, зависят от механических свойств самой мембраны. Исследование движения и осцилляции мембраны бактериальных клеток с помощью АСМ является неинвазивным и не зависит от использования химических красителей,

INTRODUCTION

Atomic force microscopy (AFM) is a traditional instrument to research the morphology of bacteria cells, allowing study in detail the structure and adhesive properties of the surface of cell membrane, evaluation of cell adsorption on different substrates and the effect of drugs on cell. Besides, AFM can be

used as a sensor to determine metabolism of bacteria in various medium conditions and under the influence of reagents.

This method is based on the idea that molecular identification on a micromechanical system surface (for example, cantilever) leads to bending (displacement) of of cantilever in the range of several nanometers

(static mode) or changing of its resonant frequency (dynamic mode) [3–5]. These systems have unique properties since they allow of conducting a study without markers and have a high potential sensitivity. It was shown, that low-frequency oscillations of atomic-force microscopy cantilevers can be used to characterize bacteria,

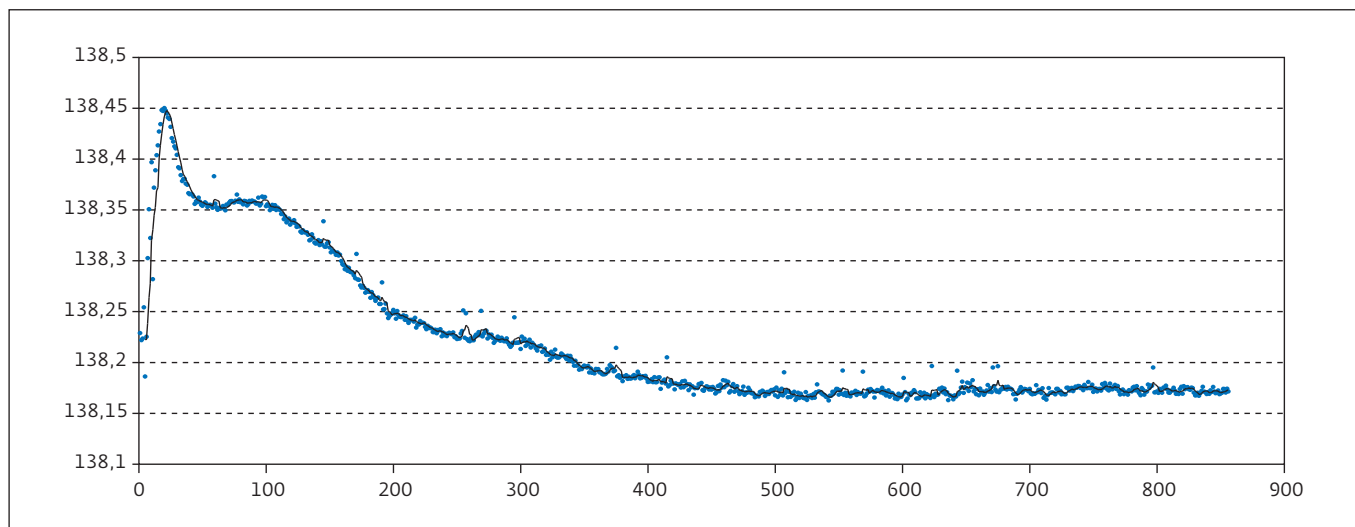


Рис.2. На поверхность пьезокерамического биочипа нанесли лак, вследствие чего изменилось поверхностного натяжение, что привело к увеличению резонансной частоты колебаний биочипа. В процессе измерений слой лака высыхает, что возвращает кривую к исходным значениям. По оси абсцисс – количество измерений, по оси ординат – значения резонансной частоты
 Fig.2. The biochip piezoceramic surface was coated with varnish, and, accordingly, the surface tension has changed which has led to a greater resonant frequency of the biochip oscillations. While measuring, the varnish layer dries up, and the curve returns to the initial values. X axis – the number of measurements, Y axis – the resonance frequency values

флуоресцентных маркеров или квантовых точек. Скорость и амплитуда движения отражают активные метаболические процессы, рост, подвижность.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В данной работе мы исследуем характерное движение и осцилляции мембраны бактериальных

клеток с помощью измерительной схемы зондового микроскопа "ФемтоСкан". При изменениях на поверхностном слое вследствие адсорбции частиц (в случае обнаружения) или при изменении поверхностного натяжения изменяется резонансная частота колебаний пьезокерамического биочипа, что может быть зарегистрировано схемой и преобразовано в количественный результат

rapidly test their sensitivity sensitivity to antibiotics and determine stability within a few minutes [6, 7]. Practically, bacteria are placed onto the cantilever and their oscillations are detected that directly correlate with cell metabolism. It was demonstrated, that the cantilever movement is due to membrane oscillations in living cells and disappears in case of the death of the bacterium [8].

Specific region of the *E.coli* bacteria cell oscillations is 0.01-1 kHz [9].

There are a number of biological processes occurring within

living bacteria dependent on the mechanical properties of the membrane itself. The study of the oscillations and movement of the bacteria cell membranes by AFM is non-invasive and does not depend on chemical dyes, fluorescent markers or quantum dots. The speed and amplitude of the movement reflect active metabolic processes, growth, and mobility.

RESEARCH METHODS

In this work, we study the specific movement and oscillations of the bacteria cell membrane using the FemtoScan scanning probe microscope measuring

system. When the surface layer changes due to adsorption of particles (if detected) or when the surface tension changes, a resonant frequency of piezoceramic biochip, which can be detected by the measuring circuit and transformed into the quantitative result using by FemtoScan Online software. Control measurement of the biochip oscillations is shown in Fig.1.

In parallel with the study of bacteria using atomic force microscope for visualization, it is possible to use the microlens microscopy method [10, 11].



с помощью ПО "ФемтоСкан Онлайн". Контрольное измерение колебаний биочипа представлено на рис.1.

Параллельно с наблюдением бактерий в атомно-силовой микроскоп для их визуализации можно использовать метод микролинзовой микроскопии [10, 11]. Оптическая микроскопия ограничена дифракционным пределом, который удается преодолеть благодаря использованию линз микронного диаметра. На рис.4 представлено изображение калибровочного образца – поверхности микросхемы, полученное с помощью оптического микроскопа Axio Scope 40 Carl Zeiss и микролинзы диаметром 20 мкм из титаната бария, расположенной на поверхности образца.

ВЫВОДЫ

В наших исследованиях микролинзовая микроскопия позволяет исследовать образцы бактерий параллельно с зондовой микроскопией за счет использования установки для совмещенной зондовой, оптической и микролинзовой микроскопии. При этом микролинзовая микроскопия существенно сокращает требуемое время на поиск бактерий на подложке для последующих детальным измерений методами сканирующей зондовой микроскопии.

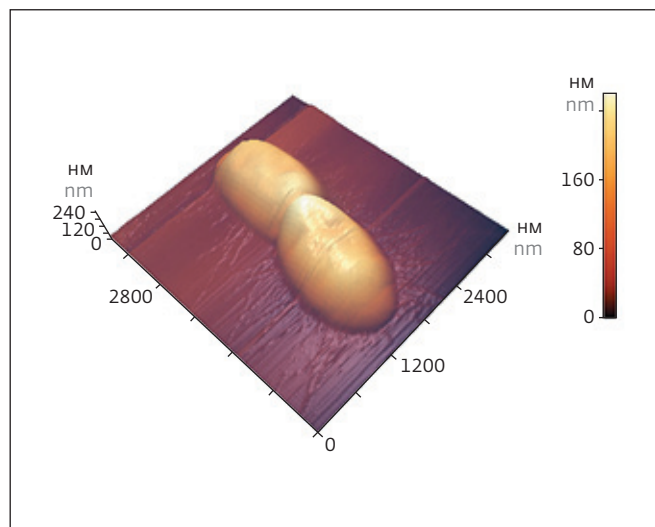


Рис.3. Изображение кишечной палочки. Живые или нет?
Fig.3. E.coli bacterium image. Alive or not?

Часто для оценки состояния бактериальной клетки статического изображения недостаточно. Требуется проводить комплексное наблюдение во времени с применением набора методов. Для этого уверенно подходят атомно-силовая микроскопия, микролинзовая микроскопия и регистрация колебаний мембраны клетки с помощью микромеханической системы методом резонанса.

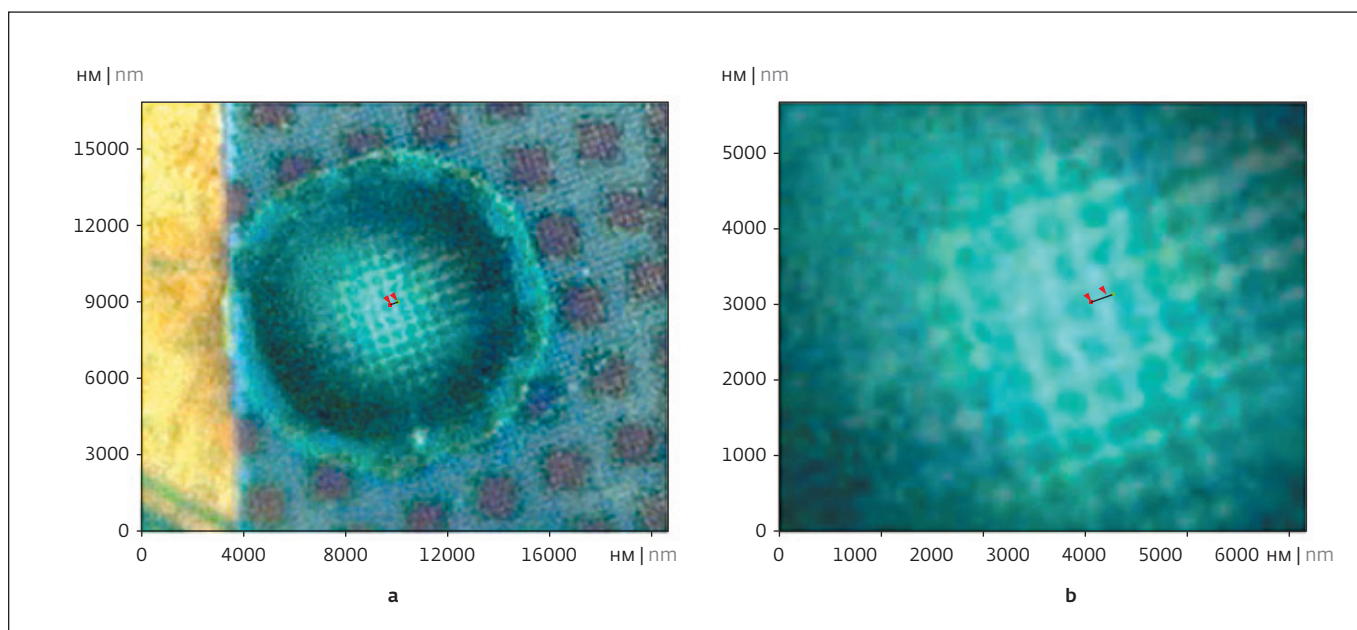


Рис.4. а – изображение поверхности микросхемы; б – увеличенное изображение сквозь микролинзу позволяет визуализировать паттерн, расстояние между метками составляет 150 нм. Обработано в ПО "ФемтоСкан Онлайн"
Fig.4. a – chip surface image; b – the enlarged image obtained through the microlens allows of visualization of the pattern. The distance between the markers is 150 nm. Image processed using FemtoScan Online software



БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Лондонского Королевского Общества № 21-58-10005, РФФИ, проект № 20-12-00389, РФФИ, проект № 20-32-90036.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Morency-Potvin P., Schwartz D.N., Weinstein R.A. Antimicrobial stewardship: How the microbiology laboratory can right the ship. *Clin. Microbiol. Rev.* 2017, 30, 381–407. <https://doi.org/10.1128/CMR.00066-16>
2. Huber F., Lang H.P., Backmann N., Rimoldi D., Gerber C. Direct detection of a BRAF mutation in total RNA from melanoma cells using cantilever arrays. *Nat Nanotechnol.* 2013, 8(2), 125–129. <https://doi.org/10.1038/nnano.2012.263>
3. Etayash H., McGee A.R., Kaurac K., Thundat T. Nanomechanical sandwich assay for multiple cancer biomarkers in breast cancer cell-derived exosomes. *Nanoscale*, 2016, 8, 15137–15141. <https://doi.org/10.1039/C6NR03478K>
4. Duffy J., Padovani F., Brunetti G., Noy P., Certa U., Hegner M. Towards personalised rapid label free miRNA detection for cancer and liver injury diagnostics in cell lysates and blood based samples. *Nanoscale*, 2018, 10, 12797–12804. <https://doi.org/10.1039/C8NR03604G>
5. Longo G., Alonso-Sarduy L., Marques Rio L., Bizzini A., Trampuz A., Notz J., Dietler G., Kasas S. Rapid detection of bacterial resistance to antibiotics using AFM cantilevers as nanomechanical sensors. *Nat. Nanotechnol.*, 2013, 8(7), 522–526. <https://doi.org/10.1038/nnano.2013.120>
6. Kasas S., Ruggeri F.S., Benadiba C., Maillard C., Stupar P., Tournu H., Dietler G., Longo G. Detecting Nanoscale Vibrations as Signature of Life. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2015, 112, 378–381.
7. Mustazzolu A., Venturelli L., Dinarelli S., Brown K., Floto R.A., Dietler G., Fattorini L., Kasas S., Girasole M., Longo G. A Rapid Unraveling of the Activity and Antibiotic Susceptibility of Mycobacteria. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2019, 63. <https://doi.org/10.1128/AAC.02194-18>
8. Mertens J., Cuervo A., Carrascosa J.L. Nanomechanical detection of Escherichia coli infection by bacteriophage T7 using cantilever sensors. *Nanoscale*, 2019, 11, 17689. <https://doi.org/10.1039/c9nr05240b>
9. Yaminsky I.V., Akhmetova A.I., Senotrusova S.A. Microlens microscopy opens up new possibilities in the visualization of biological objects. *Medicine and high technologies*, 2021, 1, 51–55. <https://doi.org/10.34219/2306-3645-2021-11-1-51-55>
10. Yaminsky I.V., Akhmetova A.I., Senotrusova S.A. Optical microscopy using microlenses. *Nanoindustry*, 2021, 14, 3–4, 22–25. <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2021.14.3-4.184.187>

Декларация о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в данной статье.

Optical microscopy is limited by a diffraction limit, which can be overcome through the use of the lens of micrometer diameter. Fig.4 demonstrates the image of the calibration sample – chip surface obtained by an Axio Scope 40 Carl Zeiss optical microscope and microlens dia. 20 μm made of barium titanate placed on the sample surface.

CONCLUSIONS

In our research the microlens microscopy makes it possible to study bacteria samples in parallel with the probe microscopy due to use of the combined device

for probe, optical and microlens microscopy. In this case, the microlens microscopy significantly reduces the time necessary to find bacteria on a substrate for subsequent detailed measurements performed by the methods of scanning probe microscopy.

Quite often, in order to assess a bacterial cell condition, it is not sufficient to have its static image. It is necessary to conduct a comprehensive observation over time using a set of methods. To solve the problem, the atomic force microscopy, microlens microscopy and registration of the bacteria cell membrane

oscillations using a micromechanical system of resonance method are confidently suitable.

ACKNOWLEDGEMENTS

The study was completed with the financial support of the RFBR and the London Royal Society No. 21-58-10005, RNF, Project No. 20-12-00389, RFBR, Project No. 20-32-90036. ■

Declaration of Competing Interest.

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.



Международная выставка и форум
по фармацевтике и биотехнологиям

5-7 апреля 2022

Санкт-Петербург, Экспофорум, павильон Н

gotoipheb.com

Санкт-Петербург –
лучшее место
для бизнеса



19

стран



3000+

посетителей



100+

экспонентов



Международное событие для участников фармацевтического и смежных рынков (БАД и здоровое питание)

признанная платформа для встречи с ведущими фармацевтическими компаниями
со всего мира на одной площадке

Поддержка:



САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКАЯ
ТОРГОВО-ПРОМЫШЛЕННАЯ
ПАЛАТА

СПХФУ



Санкт-Петербургский
государственный химико-
фармацевтический университет

Организатор:

