



SERCA сократительная активность стимулируется даже в случае редко следующих импульсов (при  $cG_2 > 0.07$ ), так как их амплитуда значительно превышает порог.

Результаты данной работы будут использованы для дальнейшей разработки более полной математической модели, пригодной для моделирования нейрогенных путей активации и ослабления КГМ.

### Список литературы

1. Фундаментальная и клиническая физиология / пер с англ. и нем. под ред. А. Камкина, А. Каменского. М.: Академия, 2004. 340 с.; 342 с.
2. Keener J., Sneyd J. Mathematical Physiology. N.Y.: Springer-Verlag, 1998. P. 163.
3. Yang J., Clark J. W., Brayn R. M., Robertson C. S. Mathematical modeling of the nitric oxide/cGMP pathway in the vascular smooth muscle cell // Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2005. Vol. 289. H886–H897.
4. Carvajal J. A., Germain A. M., Huidobro-Toro J. P., Weiner C. P. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation // J. Cell Physiol. 2000. Vol. 184. P. 409–420.
5. Lincoln T. M., Dey N., Sellak H. cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression // J. Appl. Physiol. 2001. Vol. 91. P. 1421–1430.
6. Lucas K. A., Pitari G. M., Kazerounian S., Ruiz-Stewart I., Park J., Schulz S., Chepenik K. P., Waldman S. A. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP // Pharmacological reviews. 2000. Vol. 52. P. 375–414.
7. Houart G., Dupont G., Goldbeter A. Bursting, Chaos and Birhythmicity Originating from Self-modulation of the Inositol 1,4,5-trisphosphate Signal in a Model for Intracellular  $Ca^{2+}$  Oscillations // Bulletin of Mathematical Biology. 1999. № 61. P. 507–530.
8. Dupont G., Goldbeter A. One-pool model for  $Ca^{2+}$  oscillations involving  $Ca^{2+}$  and inositol 1,4,5-trisphosphate as co-agonist for  $Ca^{2+}$  release // Cell Calcium. 1993. № 14. P. 311–322.
9. Takazawa K., Lemos M., Delvaux A., Lejeune C., Dumont J. E., Erneux C. Rat brain inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase.  $Ca^{2+}$ sensitivity, purification and antibody production // Biochemical J. 1990. Vol. 268. P. 213–217.
10. Takazawa K., Passareiro H., Dumont J.E., Erneux C. Purification of bovine brain inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase. Identification of the enzyme by sodium dodecyl sulphate/polyacrylamide-gel electrophoresis // Biochemical J. 1989. Vol. 261. P. 483–488.
11. Berridge M. J. Inositol trisphosphate and calcium signaling // Nature. 1993. Vol. 361. P. 315–325.
12. Nillson H., Aalkjar C. Vasomotion: Mechanisms and Physiological Importance // Molecular Interventions. 2003. № 3. P. 79–89.
13. Bursztyn L., Eytan O., Jaffa A. J., Elad D. Mathematical model of excitation-contraction in a uterine smooth muscle cell // Amer. J. Physiol. Cell. Physiol. 2007. № 292. P. 1816–1829.

УДК 579.23:53.086:615.281

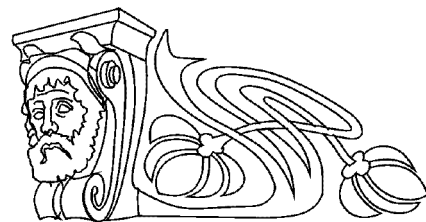
## КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ БИОПЛЕНК МИКРООРГАНИЗМОВ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

П. С. Ерохин, О. С. Кузнецов, Н. П. Коннов, Н. А. Видяева, Д. В. Уткин

ФКУЗ Российский научно-исследовательский  
противочумный институт «Микроб», Саратов  
E-mail: rusrap@microbe.ru

Проведены исследования биопленок *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* методом атомно-силовой микроскопии (АСМ). С помощью комплексного подхода на основе полуконтактного режима АСМ показано, что биопленки *S. aureus* и *E. coli* представляют собой организованное сообщество микроорганизмов. Методами рассогласования и отображения фазы изучен внеклеточный матрикс биопленок *S. aureus* и *E. coli*, подтверждены размеры бактерий и биопленок. Полуконтактный метод позволяет выявлять S-слои на поверхности микроорганизмов, контактный – различий в адгезии бактерий.

**Ключевые слова:** атомно-силовая микроскопия, внеклеточный матрикс, биопленка, микроорганизмы.



### A Complex Approach for the Study of Biofilms of Microorganisms by Atomic Force Microscopy

P. S. Erokhin, O. S. Kuznetsov, N. P. Konnov,  
N. A. Vidyeva, D. V. Outkin

The biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* have been investigated by atomic force microscopy (AFM). The usage of complex approach of semi-contact AFM mode has shown that the *S. aureus* and *E. coli* biofilms represent an organized community of microorganisms. Semicontact error mode and phase imaging mode investigation of extracellular matrix of *S. aureus* and *E. coli* biofilms,



confirms dimensions of bacteria and biofilms. Semicontact mode let a development S-layer on surface of microorganisms, contact – different in adhesive force of bacteria.

**Key words:** atomic force microscopy, extracellular matrix, biofilm, microorganisms.

## Введение

Одним из основных способов выживания бактерий во внешней окружающей среде является способность к образованию биопленки. Изучение этой способности относится к одной из наиболее интересных областей в биологии и медицине [1–5].

Атомно-силовая микроскопия, физической основой функционирования которой являются короткодействующие силы взаимодействия между исследуемой поверхностью и зондом, является перспективным методом биологических и медицинских исследований, позволяющим изучать особенности структуры поверхности как бактерий, так и их ассоциаций, различных таксономических групп [6].

Современные исследования биопленок с использованием микроскопической техники направлены на выявление внеклеточного матрикса, образуемого сообществом микроорганизмов [6, 7], изучение его физических, биохимических и топографических свойств [8]. Особое внимание уделяется влиянию на них антимикробных препаратов [3, 4].

Целью данной работы явилось комплексное применение трех методов: полуконтактного, рассогласования и отображения фазы полуконтактной АСМ и метода модуляции силы контактного режима сканирования для изучения биопленок грамположительных и грамотрицательных бактерий на примере *E. coli* и *S. aureus*.

## 1. Материалы и методы

В работе использовались штаммы *E. coli* M-17 и *S. aureus* A-100. При исследовании биопленок на абиотической поверхности, культуры выращивали в LB бульоне на круглом покровном стекле (Merck, Германия) диаметром 18 мм, помещенном в чашки Петри диаметром 4 см, в течение 24 ч при температуре 37 °С. Дополнительно штамм *E. coli* M-17 выращивали в течение 30 мин в питательной среде с добавлением антибиотика «Цефазолин – АКОС» (Синтез, Россия) в концентрации 50 мкг/мл, для создания более выраженных неблагоприятных условий. Фиксация и обеззараживание материала проводились с использованием 2.5 % раствора глутаральдегида с экспозицией 2 часа при температуре 4 °С, по-

сле чего изучаемый объект (приготовленный препарат) тщательно отмывали бидистиллированной водой и высушивали на воздухе при комнатной температуре. Актуальность выбора этого антибиотика связана с его активностью в отношении грамотрицательных бактерий. Он относится к группе цефалоспоринов, механизм действия которых связан с подавлением синтеза пептидогликанов и высвобождением аутолитических ферментов, что приводит к разрушению клеточной стенки микроорганизма и его гибели.

Изучение биопленок проводили в световом микроскопе (CarlZeiss, Германия), а затем в атомно-силовом микроскопе SolverP47-PRO (NT-MDT, Россия) с использованием кремниевых кантиллеров, напыленных золотом NSG01 (NT-MDT, Россия) для полуконтактной АСМ (резонансная частота кантиллера составляла 120 кГц, константа жесткости – 5.5 Н/м). Обработка изображений выполнялась в программе Nova (NT-MDT, Россия), которая дает возможность редактировать полученные данные, а также представлять их в дву- (2D) и трехмерном (3D) формате.

Линейные размеры бактерий измеряли в мкм, шероховатость – в нм. Регистрацию амплитуды колебаний кантиллера для более детальной визуализации ультраструктуры бактерий проводили методом рассогласования. Фазовые изображения формировали в следующем стиле: темные пиксели соответствовали нулевой фазе, светлые пиксели – максимуму фазы. Амплитуду Set Point регистрировали в нА, которая изменялась от минимальных до максимальных величин в зависимости от размера бактерий и условий сканирования.

## 2. Результаты

Образование биопленки штаммами *E. coli* и *S. aureus* предварительно изучалось на стеклах в световом микроскопе, после чего отбирались те образцы, на которых наблюдалось сформированное «сообщество» микроорганизмов.

Для более детального изучения архитектуры биопленок *S. aureus* и *E. coli* применяли три метода АСМ: полуконтактный, рассогласования и отображения фазы (фазового контраста).

**Полуконтактный метод** использовали для получения дву- и трехмерных топографических изображений бактерий и определяли линейные размеры клеток (длину, ширину, высоту, шероховатость). Полученные данные представлены в таблице. Бактерии, входящие в состав биопленки, отличались полиморфизмом, у *S. aureus* обнаруживали тяжи.



## Характеристики бактерий и биопленок

Параметр	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Длина, мкм	0.7–1.3	0.7–1.3
Ширина*, мкм	0.81–1.45	0.7–1.3
Высота**, мкм	0.8–1.3	0.7–1.3
Толщина жгутиков, нм	75–80	–
Шероховатость бактерий, нм	26–45	4–8
Толщина матрикса, нм	200–300	60–80
Шероховатость биопленки, нм	251.347	94.4257
Сдвиг фазы бактерия – покровное стекло, °	10–12	40–42
Сдвиг фазы матрикс – бактерия, °	3–4	32–34
Сдвиг фазы покровное стекло – матрикс, °	8–9	8–10
Сила адгезии бактерий, нН	14–21	15–22
Сила адгезии матрикса, нН	15–24	16–25

Примечание. \*параметр, определяемый в направлении, параллельном подложке; \*\*параметр, определяемый в направлении, перпендикулярном подложке.

Для определения шероховатости поверхности бактерий также был использован полуконтактный метод. Шероховатость бактериальных клеток характеризует наличие *S*-слоя [9] на поверхно-

сти микроорганизмов (рис. 1, а, 2, а, таблица), функция которого состоит в сохранении формы клеток, защите от агрессивных факторов среды, во взаимодействии с клетками про- и эукариот.

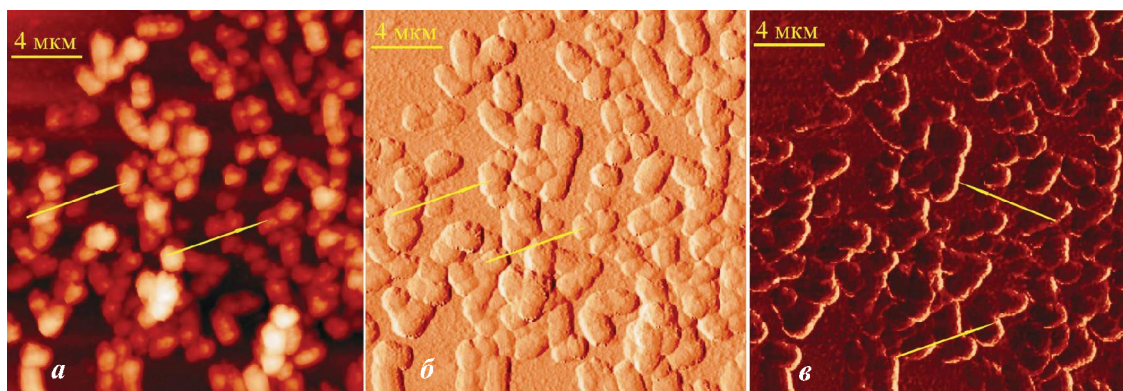


Рис. 1. АСМ изображения клеток *S. aureus*: а – полуконтактный метод; б – метод рассогласования; в – метод отображения фазы. Стрелками обозначено: а, б – бактерии; в – внеклеточный матрикс биопленки *S. aureus*. Размер изображений 20 × 20 мкм

Изучение шероховатости также способствует определению наличия и распределения основного компонента поверхности бактериальной клетки – пептидогликана.

**Метод рассогласования.** Этот метод, основанный на регистрации амплитуды колебаний кантилевера при сканировании поверхности объекта, применялся для выявления дополнительных особенностей биопленки микроорганизмов. Были выявлены тонкие детали ультраструктуры биопленки, в частности внеклеточный матрикс биопленок *S. aureus* и *E. coli* (рис. 1б, 2б). Установлена его размерность (см. таблицу). Кроме того, метод рассогласования позволил выявить жгутики и пили бактерий

*E. coli* и определить их размерность (см. таблицу).

**Метод отображения фазы.** Метод отображения фазы чувствителен к взаимодействию кантилевер – объект, что способствует определению механических, химических, топографических и гетерогенных свойств объекта исследований. Этим методом показана зависимость диссипации энергии (переход кинетической энергии колебаний зонда в энергию электрического тока) колебаний кантилевера от адгезивного взаимодействия между кантилевером и поверхностью объекта исследований, а также определение его локальных вязкоэластических свойств.



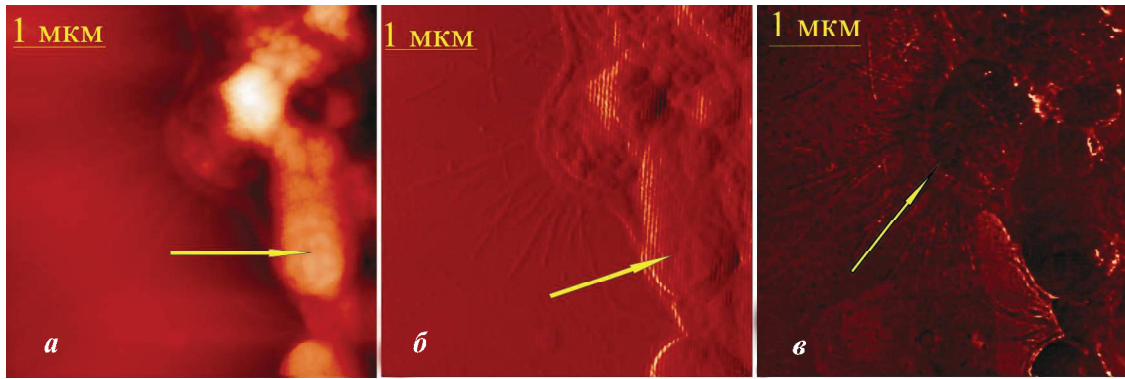


Рис. 2. АСМ изображения клеток *E. coli*: а – полуконтактный метод; б – метод рассогласования; в – метод отбраживания фазы. Стрелками обозначено: а, б – бактерии; в – внеклеточный матрикс биопленки *E. coli*

При исследовании биопленок методом отбраживания фазы была проведена регистрация изменения амплитуды и сдвиг фазы колебаний кантилевера (рис. 1, в, 2, в, 3 а, б). Фазовые изображения имели в своем составе темные и светлые пиксели. Значения фазовых сдвигов приведены в таблице. Изменения фазы колебаний кантилевера связаны с взаимным расположением клеток микроорганизмов и матрикса (у стафилококка он

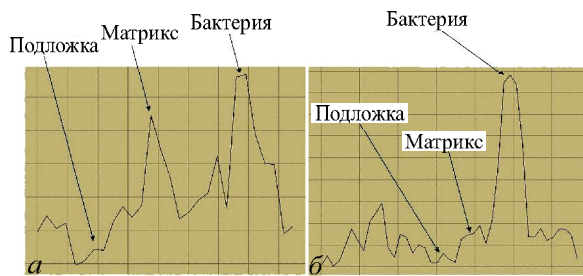


Рис. 3. Профиль фазового сдвига на выбранном участке изображения: а – *E. coli*; б – *S. aureus*. По оси абсцисс отложена длина в мкм, по оси ординат – градусы

расположен на бактериях, у кишечной палочки – около них), различия в их линейных размерах, жесткости и адгезивности (см. рис. 1, в, 2, в, таблица). Определение силы адгезии проводили как для бактерий, так и для матрикса **методом модуляции силы**. Соответствующие значения приведены в таблице.

Для повышения визуальной четкости изображения, контрастирования локальной неоднородности, выделения границы объектов, имеющих разную высоту, применяли фильтр HighPass 3x3 программы Nova. При выполнении фильтрации изображения *E. coli* дополнительно были выявлены гранулы диаметром 10–80 нм на поверхности бактерий (рис. 4, в). По всей вероятности, они имеют полисахаридную природу.

Для улучшения качества визуализации полученных данных был применен метод совмещения изображений. В качестве примера была выбрана *E. coli*. В результате более четко просматривались субклеточные структуры и внеклеточный матрикс (см. рис. 4, а, б).

Для улучшения качества визуализации полученных данных был применен метод совмещения изображений. В качестве примера была выбрана *E. coli*. В результате более четко просматривались субклеточные структуры и внеклеточный матрикс (см. рис. 4, а, б).

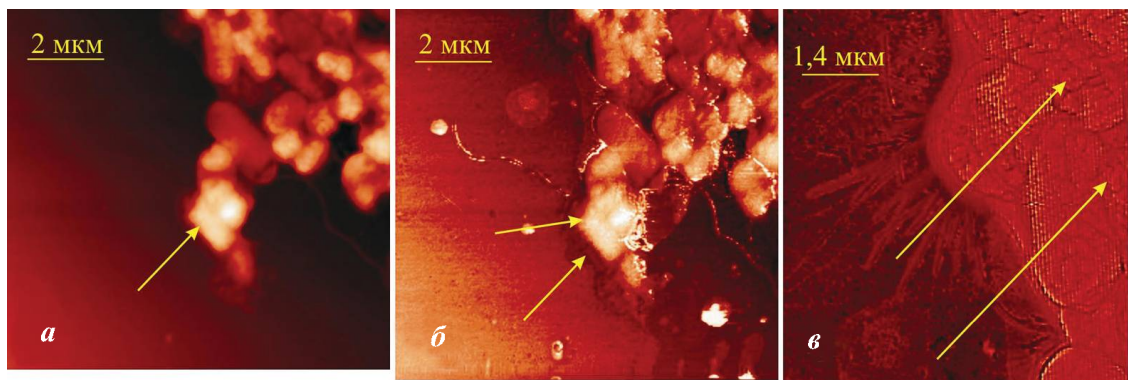


Рис. 4. Совмещение АСМ изображений *E. coli*: а – исходное изображение, б – после совмещения, в – фильтрация изображения. Стрелками отмечено: а – бактерии, б – бактерии и матрикс, в – гранулы



### Заключение

Таким образом, используя комплексный подход, включающий три метода полуконтактного режима (полуконтактный, рассогласования, отображения фазы) и метод модуляции силы контактной АСМ с этапом наложения изображения, на примере *E. coli* и *S. aureus* проведен субморфологический анализ микроорганизмов и образуемой ими биопленки. Используя инструменты программы, мы определили размеры бактерий и внеклеточного матрикса. Полученные размеры бактерий сопоставимы с данными, приведенными в определителе бактерий Берджи [10]. Изменением фазы колебаний кантилевера и методом модуляции силы определили локальную вязкоупругость и адгезивные свойства подложки, бактерий, биопленки.

### Список литературы

1. Коннов Н. П., Попов Н. В., Величко Л. Н., Князева Т. В. Феномен образования биопленок *Yersinia pestis* в организме блох // Паразитология. 2009. Т. 43, № 4. С. 330–337.
2. Juda M., Paprota K., Jaloza D., Malm A., Rybojad P., Gozdzik K. EDTA as a potential agent preventing formation of *Staphylococcus epidermidis* biofilm on polichloride vinyl biomaterials // Ann. Agric. Environ. Med. 2008. Vol. 15. P. 237–241.
3. Lynch S. V., Mukundakrishnan K., Benoit M. R., Ayyaswamy P. S., Matin A. *Escherichia coli* biofilms formed under low-shear modeled microgravity in a ground-based system // Appl. and Environ. Microbiol. 2006. Vol. 72, № 12. P. 7701–7710.
4. Oh Y. J., Jo W., Yang Y., Park S. Influence of culture conditions on *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formation by atomic force microscopy // Ultramicrosc. 2007. Vol. 101. P. 869–874.
5. Hammer M. U., Brauser A., Olak C., Brezesinski G., Goldmann T., Gutschmann T., Andra J. Lipopolysaccharide interaction is decisive for the activity on the antimicrobial peptide NK-2 against *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* // Biochem. J. 2010. Vol. 427. P. 477–488.
6. Pham D. K., Ivanova E. P., Wright J. P., Nicolau D. V. AFM analysis of the extracellular polymeric substances (EPS) released during bacterial attachment on polymeric surfaces // Proc. SPIE. 2003. Vol. 4962. P. 151–159.
7. Raspanti M., Congiu T., Guizzardi S. Tapping mode atomic force microscopy in fluid of hydrated extracellular matrix // Matrix Biol. 2001. Vol. 20, № 8. P. 601–604.
8. Volle C. B., Ferguson M. A., Aidala K. E., Spain E. M., Nunez M. E. Spring constants and adhesive properties of native bacterial biofilm cells measured by atomic force microscopy // Coll. Surf. B Biointerfaces. 2008. Vol. 67, № 1. P. 32–40.
9. Ерошенко Г. А., Коннов Н. П., Кутырев В. В., Вудяева Н. А., Шавина Н. Ю., Одинокоев Г. Н., Кузнецов О. С. Изучение способности к образованию биопленок у штаммов *Yersinia pestis* основного и неосновных подвидов // Журн. микробиол., эпидем. и иммунобиол. 2009. Т. 5. С. 13–19.
10. Определитель бактерий Берджи : в 2 т. / пер. с англ. ; под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли и С. Уилльямса. М. : Мир, 1997.

УДК 621.371 (075.8)

## ЗАКОНЫ СОХРАНЕНИЯ И ПЛОТНОСТИ ЭНЕРГИИ И ИМПУЛЬСА ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ В ДИСПЕРГИРУЮЩЕЙ СРЕДЕ

М. В. Давидович

Саратовский государственный университет  
E-mail: DavidovichMV@info.sgu.ru

В работе анализируются некоторые противоречия современной электродинамики сплошных сред, а именно вид плотностей энергии и импульса поля и системы поле–вещество, тензора энергии-импульса и представление скоростей переноса энергии и импульса. На основе нестационарного подхода получены балансные уравнения для плотностей энергии и импульса системы поле–вещество с зависимостью от предыстории процесса соз-

дания поля, а также в нестационарном случае определены скорости их переноса. Найдены плотности энергии и импульса монохроматического поля. Показано выполнение для них локальных и глобальных законов сохранения.

**Ключевые слова:** Абрагама–Минковского контрверсия, тензор энергии-импульса, плотность энергии, скорость переноса энергии, фазовая скорость, групповая скорость.

