

УСПЕХИ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ В МИКРОБИОЛОГИИ

В данном обзоре рассмотрены возможности использования атомно-силовой микроскопии в решении микробиологических задач за последнее десятилетие. Основное внимание уделено достижениям и успехам в области биодетекции, вирусологии и изучению влияния биогенных и абиогенных факторов на бактериальные клетки. Представленные результаты демонстрируют потенциал атомно-силовой микроскопии в обнаружении и идентификации единичных клеток и молекул, исследовании механических и морфологических свойств бактериальных клеток в ответ на различные воздействия, а также изучении межмолекулярных и внутримолекулярных взаимодействий.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, бактериальные клетки, идентификация молекул, детектирование вирусных частиц.

Развитие микробиологии, как науки изучающей строение, жизнедеятельность и экологию микроорганизмов, невозможно представить без микроскопических методов исследования. Так, именно с первым описанием бактериальных клеток, увиденных с помощью оптического микроскопа Антони ван Левенгуком в 17 веке, начался описательный этап развития микробиологии. С тех пор методы визуализации непрерывно совершенствовались и, на сегодняшний день, у исследователей имеется целый арсенал всевозможного микроскопического инструментария, являющегося, однако, разновидностями двух видов микроскопов - оптического и электронного. В микробиологии оптическая микроскопия является бесспорным лидером среди всех методов визуализации в силу доступности, относительной простоты приготовления исследуемых образцов, а также возможности изучения биологических структур в близких к природным условиях. Слабой стороной оптических приборов является ограниченная дифракционным пределом разрешающая способность. Именно поэтому ультраструктуру микроорганизмов удалось изучить и описать лишь с появлением электронной микроскопии в 40-е годы XX века. Однако, электронная микроскопия, до настоящего времени являющаяся единственным методом визуализации нанометрового разрешения, имеет целый ряд недостатков, главные из которых – сложность приготовления препаратов и необходимость проведения исследований в условиях высокого вакуума.

В 1981 году был изобретен сканирующий зондовый микроскоп, в основе работы которого лежит регистрация взаимодействия, возника-

ющего между сенсором (зондом) и поверхностью образца при сканировании. Результатом сканирования является цифровое трехмерное изображение поверхности изучаемых структур с нанометровым латеральным и пространственным разрешением. В настоящее время существует целое семейство зондовых микроскопов, один из которых - атомно-силовой микроскоп (АСМ), наиболее активно используется для изучения биообразцов микронного и субмикронного уровня организации благодаря простой процедуре пробоподготовки и возможности визуализации объектов практически в любой среде исследования.

Многочисленные исследования, проводимые в течение последних десятилетий, позволили переосмыслить возможности и раскрыть новые аспекты использования АСМ. Так АСМ уже является не просто методом визуализации, а нанотехнологическим инструментом, позволяющим манипулировать отдельными атомами, исследовать межмолекулярные силы взаимодействия, а также картировать физико-химические и иные свойства поверхности отдельных молекул и микроорганизмов [1]–[3].

Данный обзор посвящен рассмотрению различных возможностей использования атомно-силовой микроскопии в решении микробиологических задач, продемонстрированных в работах отечественных и зарубежных исследователей за последнее десятилетие.

Принцип действия атомно-силового микроскопа заключается в сканировании поверхности образца атомарно острой иглой (зондом), расположенной на конце упругой консоли, именуемой кантилевером. Силы взаимодействия,

возникающие между поверхностью исследуемого образца и зондом при их сближении, приводят к изгибу консоли. Передвижение иглы по трем координатам осуществляется прецизионным пьезоэлектрическим двигателем. Деформацию консоли обычно регистрируют с помощью оптической системы, состоящей из лазера, излучение которого падает на тыльную зеркальную сторону кантилевера, и четырехсегментного фотодетектора, на который падает отраженный луч. Любые возвышенности или впадины, встречающиеся на пути поступательно движущейся иглы, вызывают изгиб кантилевера, что приводит к отклонению луча. Регистрируемая таким образом величина изгиба в процессе сканирования позволяет формировать трехмерный рельеф поверхности образца в режиме реального времени. Разрешающая способность данного метода составляет примерно 0,1–1 нм по горизонтали и 0,01 нм по вертикали.

Режимы работы. В зависимости от расстояния между иглой и образцом, различают контактный, бесконтактный и полуконтактный режимы работы атомно-силового микроскопа. При контактном режиме расстояние от иглы до образца составляет порядка нескольких десятых нанометра. В этом случае доминирующими являются силы отталкивания, приводящие к изгибу кантилевера. В бесконтактном режиме (режиме притяжения) кантилевер с помощью пьезокристалла колеблется над изучаемой поверхностью с амплитудой ~5 нм, превышающей расстояние между зондом и поверхностью. По изменению амплитуды или сдвигу резонансной частоты колебаний в ходе сканирования поверхности определяется сила притяжения и формируется изображение поверхности. В полуконтактном режиме, называемом иногда режимом постукивания, кантилевер также совершает вынужденные колебания, но уже с гораздо большей амплитудой ~100 нм, при этом слегка касаясь поверхности образца в нижней точке своих колебаний.

Атомно-силовая спектроскопия (АСС) – это режим работы АСМ, позволяющий изучать локальные физико-механические свойства поверхности, используя зонд в качестве сенсора. АСС основана на регистрации силовых кривых, отображающих отклонение кантилевера при взаимодействии с поверхностью в зависимости от расстояния между зондом и образцом в вертикальном направлении. Силовая кривая, записанная в процессе вдавливания (идентифици-

вания) зонда известной геометрии в поверхность материала, позволяет количественно оценить силу адгезии и модуль упругости исследуемого образца.

Исследование бактериальных клеток

Благодаря своим возможностям, АСМ может быть использован для комплексной оценки состояния бактериальных клеток в различных условиях и при действии различных экологических факторов. Так, например, исследование штаммов *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* позволило выявить изменения морфологических характеристик в зависимости от используемой среды культивирования [4]. Известно, что для большинства бактерий характерна вариация формы и размеров в зависимости от фазы роста культуры. При исследовании особенностей процесса старения спорообразующих микроорганизмов *Bacillus cereus* методом АСМ, на различных этапах их жизненного цикла было продемонстрировано изменение как размерных характеристик, так и упругости и шероховатости клеточной стенки [5]. Длительное культивирование сопровождалось сокращением доли жизнеспособных клеток в популяции и появлением морфологически дифференцированных форм покоя – спор. Физиологические перестройки в микроорганизмах, возникающие при воздействии абиотических стрессовых факторов, отражаются в изменениях их морфологии и, поэтому, легко могут быть обнаружены с помощью АСМ. Так на примере клеток *Azotobacter chroococcum* продемонстрировано изменение размеров и структурированности поверхности в зависимости от величины и времени теплового воздействия [6]. Кроме того, в условиях теплового шока у стрессированных клеток обнаруживались вдавливания на полюсах, отсутствующие в контрольных образцах. Изменение структуры поверхности и механических свойств бактериальных клеток в кислой (рН=4) и щелочной (рН=10) средах наблюдали в работе [7]. Сравнительные исследования влияния относительной влажности (ОВ) среды на результаты АСМ измерений были описаны в работе [8] на примере модельных микроорганизмов *B. cereus* и *Escherichia coli*. Так морфологические свойства *B. cereus* оставались достаточно стабильными в широком диапазоне относительной влажности и достоверно изменялись лишь при достижении 65% ОВ, тогда как клетки *E. coli* оказывались менее устойчивыми к внешнему воз-

действию и уже при 84% ОВ отвечали ростом шероховатости и упругости клеточной стенки.

В последние годы, в связи с ростом производства углеродных наноматериалов (УНМ), активно используемыми в промышленности, пристальное внимание уделяется вопросу их биологической активности по отношению к живым системам [9], [10]. Применение метода атомно-силовой микроскопии в решении подобных задач позволяет получить уникальную информацию о характере и последствиях контакта УНМ с модельными микроорганизмами. В работах [11], [12] представлено исследование взаимодействия широкого круга углеродных наноматериалов, для каждого из которых проводилось описание характера контакта с клетками *E. coli*. Было показано, что контакт многостенных и ряда одностенных углеродных нанотрубок (ОУНТ) с поверхностью модельного микроорганизма носит вероятностный характер, а визуализируемые повреждения поверхностных структур, обуславливающие гибель *E. coli*, определяются эффектами технологических примесей, входящими в состав УНМ. Полученные результаты опровергают гипотезу прямого повреждения (прокалывания) клеток нанотрубками, заявленную авторами работы [13]. Невозможность прямого повреждения клеточной стенки ОУНТ была дополнительно продемонстрирована в работе [14]: вдавливание в клеточную стенку АСМ иглы радиусом 2 нм с силой 10 нН не приводило к последствиям, аналогичным наблюдаемым при совместной инкубации клеток с нанотрубками. В работе [15] изучалось токсичное действие углеродных нанотрубок на бактериальные сообщества. Методом АСМ было показано значительное подавление роста биопленок на поверхностях, покрытых нанокомпозитом ОУНТ-полимер ПВК, что потенциально может быть использовано для создания антибактериальных покрытий.

Исключительно актуальными являются исследования микроорганизмов, подвергнутых действию таких биогенных факторов как антибиотиков, ввиду возрастающей глобальной проблемы антибиотикорезистентности. И здесь АСМ может быть использован для оценки влияния новых препаратов с антимикробной активностью на бактериальные клетки-мишени [16]. В работе [17] показаны изменения морфологических и механических характеристик модельных клеток *E. coli* и *V. cereus*, вызванных

действием ампициллина. В ряде работ ампициллин выступает в качестве «препарата сравнения», по отношению к которому оцениваются эффекты вновь создаваемых веществ и соединений [18], [19]. Большое внимание уделяется изучению действия антимикробных пептидов, являющихся принципиально новым классом природных антибиотиков, которые могут прийти на смену традиционным препаратам [20]. В [21] проведены сравнительные исследования двух различных антимикробных пептидов – хорошо изученного магаинина 2 [22] и тромбоцитарного катионного бела (ТКБ), действие которого исследовалось методом АСМ впервые. Кроме различий в форме и степени повреждений, вызываемых указанными антимикробными пептидами, показана также большая к ним чувствительность грамотрицательных по сравнению с грамположительными бактериями, что выражалось в деформации концевых участков клеток, потере жесткости наружной мембраны, увеличению её шероховатости и формированию пор. Пример характерных повреждений показан на рисунке 1, взятом из работы [21].

Совершенствование техники и программного обеспечения зондовых микроскопов позволяет в автоматическом режиме выполнять измерения и обрабатывать множества силовых кривых в разных точках сканирования и формировать по полученным результатам изображение, соответствующее распределению локальных значений модуля Юнга или адгезионных сил по сканируемой поверхности. Подобный метод, именуемый методом силового картирования [23], был использован для выявления действия четырех антибиотиков (изониазид, этионамид, этамбутол, стрептомицин) на возбудителя туберкулеза крупного рогатого скота *Mycobacterium bovis* [24]. Использовался зонд, к поверхности которого были химически привиты углеводородные цепи. Такой кантилевер показывал большее значение адгезии на гидрофобных поверхностях. Было обнаружено, что поверхность клеток *M. bovis* после обработки антибиотиками становится более гидрофильной, что указывает на разрушение внешнего гидрофобного слоя состоящего из миколовых кислот и приводит к росту шероховатости поверхности и увеличению адгезии гидрофобного кантилевера. Указанный подход можно использовать и для выявления расположения сайтов связывания антибиотиков с поверхностью

бактериальных клеток. Функционализация зонда ванкомицином позволила авторам работы [25] с нанометровой точностью локализовать участки связывания антимикробного препарата с мембраной *Lactococcus lactis*. Более подробно о возможностях метода функционализации зонда будет описано в следующем параграфе обзора.

АСМ в задачах биодетекции

В микробиологии задача обнаружения и распознавания молекул и бактерий остается достаточно актуальной и в ряде случаев решается путем их специфического маркирования с последующим микроскопическим исследованием. В случае использования световой микроскопии это достигается использованием иммунохимических или иммунофлюоресцентных меток [26], а при электронной микроскопии распознающие антитела конъюгируются с электронно-плотными частицами, например, коллоидным золотом [27]. Разработанные на этом принципе методы иммунофлюоресцентного анализа и иммуноэлектронной микроскопии произвели в свое время революционный переворот в развитии диагностического сектора. В свою очередь использование атомно-силовой микроскопии для детекции микробиологических объектов открывает широкие перспективы для анализа иммуно- и субстрат-

специфической активности. АСМ-детекторы позволяют визуализировать отдельные молекулы белков и подсчитывать их количество и при этом теоретически не имеют ограничений концентрации чувствительности.

Принцип работы такого молекулярного АСМ-детектора в простейшем случае основан на выявлении различий в морфометрических характеристиках визуализируемых молекул. Например, критерием для выявления комплексов «антиген–антитело» может выступать высота белкового комплекса, поскольку высота составляющих этот комплекс отдельных молекул, как правило, оказывается значительно ниже [28]. На этом же принципе основана система диагностики вирусных инфекций, предлагаемая авторами [29]. Специфическое прикрепление вирусных частиц к модифицированной антителами подложке приводит к утолщению слоя нанесенных белков, что легко выявляется при сканировании. Возможность обнаружения специфических комплексов, основанная на сопоставлении гистограмм распределения размерных характеристик молекул антигена до и после взаимодействия со специфическими и неспецифическими антителами, также продемонстрирована авторами работы [30]. Применение данного подхода, однако, осложнено наличием «шумов» из-за неспецифических взаимодействий.

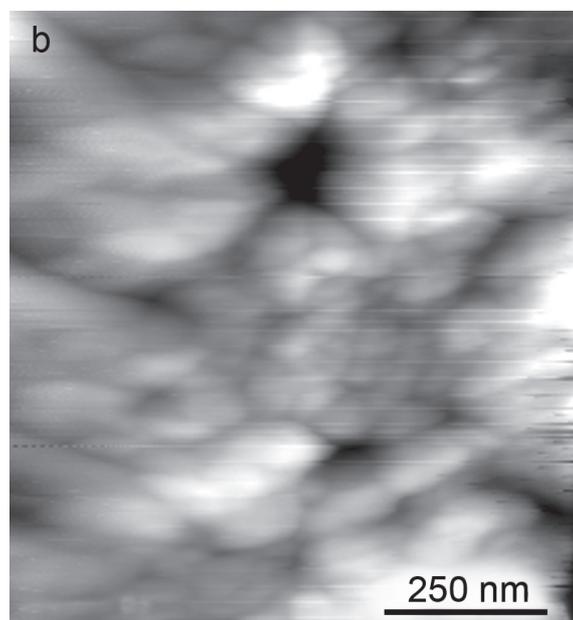
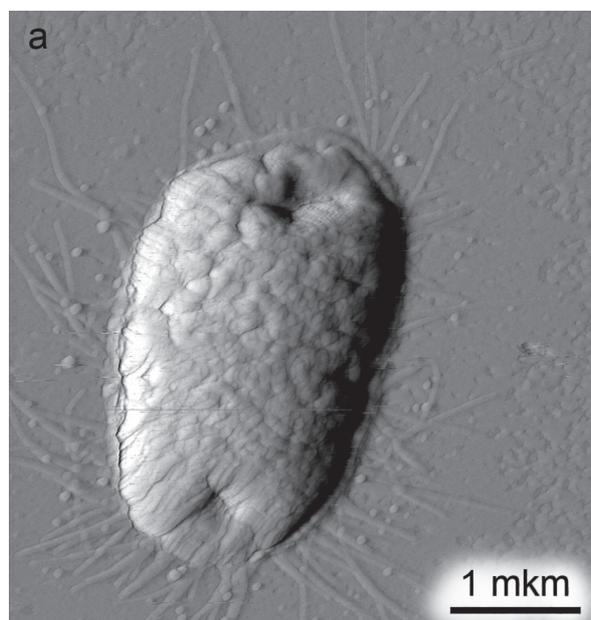


Рисунок 1. Деформации клеточной стенки *E.coli*: под действием магаина (а) и образование пор при использовании ТКБ (б)

Для повышения надежности обнаружения единичных комплексов на поверхности бактериальных клеток, распознающие антитела конъюгируют с различными маркерами, в качестве которых могут выступать частицы, размеры которых находятся в пределах хорошей разрешающей способности микроскопа и имеют отчетливую структуру [31]. Это в свою очередь позволяет не только установить факт взаимодействия, но и определить локализацию составляющих реакции антиген-антитело, а также проводить их количественный анализ. Авторами [32] с использованием золотых наноразмерных меток продемонстрирована возможность специфического маркирования и последующей идентификации бактериальных клеток в ассоциациях сложного компонентного состава. Так в смеси клеток *Staphylococcus aureus* и *Bacillus licheniformis*, конъюгаты иммуноглобулина G с коллоидным золотом обнаруживаются только на поверхности стафилококков. Полученное авторами [32] изображение меченых клеток приведено на рисунке 2.

Более сложные методы детекции методом АСМ включают в себя использование функционализированных зондов, на поверхности которых иммобилизованы различные структуры, превращающие зонд в сверхчувствительный нано/биосенсор. Факт специфического взаимодействия определяется по статическому изгибу кантилевера, по сдвигу резонансной частоты его колебаний в случае использования бесконтактных режимов сканирования [33] или по изменению силы взаимодействия с подложкой [34]. В зависимости от иммобилизуемой структуры выделяют несколько вариантов атомно-силовой спектроскопии. В химической силовой спектроскопии используется иммобилизация отдельных химических групп, в силовой спектроскопии единичных молекул (ССЕМ) – биоорганических молекул, в силовой спектроскопии единичных клеток – клеточных структур [35].

Кроме упомянутых задач биодетекции, атомно-силовая спектроскопия позволяет экспериментально охарактеризовать единичные межмолекулярные взаимодействия, что ранее было доступно лишь методам, основанных на принципе оптических и магнитных пинцетов, а также камер ламинарного потока. Так, в случае ССЕМ, регистрация и анализ силовых кривых позволяет изучить взаимодействия белок – нуклеиновая кислота [36], нуклеиновая кислота – нуклеино-

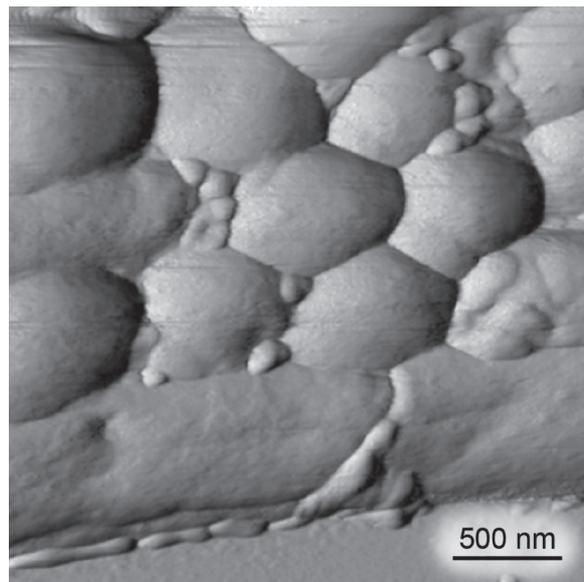


Рисунок 2. АСМ изображение бактериальных клеток в присутствии конъюгатов золота

вая кислота [37], пептид – нуклеиновая кислота [38], фермент – ингибитор [39], а также измерить силы взаимодействия фермента с субстратом, токсина с антитоксином, ближние и дальние белок-белковые взаимодействия [34].

Возможность изучения не только межмолекулярных, но и внутримолекулярных взаимодействий показана в [40]. В указанной работе один конец молекулы закреплялся на подложке, а второй – на кантилевере. Регистрация сил, возникающих при отводе кантилевера, позволяла оценивать прочность внутримолекулярных связей при разворачивании молекулы.

Имеющиеся ограничения метода АСМ-биодетекции с участием функционализированного зонда определяются необходимостью проведения сканирования в жидкостной ячейке, что усложняет процесс пробоподготовки и сканирования и часто приводит к появлению артефактов на полученных изображениях.

АСМ в вирусологии

На сегодняшний день АСМ успешно применяется для визуализации и оценки количества как целых вирусных частиц, так и составляющих их белков и нуклеопротеинов [41]–[43]. Возможность количественной дифференцировки их морфологических и механических характеристик, позволяет отличать целые, полностью сформированные вирионы от разрушенных, что особенно важно при количественном

учёте вирусных частиц в живых вакцинах, эффективность которых напрямую зависит от наличия в них цельных, способных к размножению вирионов. Так для количественного учёта вирусного материала в живой паротитной вакцине, авторами [44] использован как метод АСМ, так и количественная ПЦР в реальном времени. Сравнение полученных двумя указанными методами данных, позволило определить количество копий вирусной РНК в вакцине.

Применение спектроскопических методик АСМ к изучению вирусов, позволило получить ряд любопытных результатов, таких как: обнаружение анизотропных механических свойств полого продолговатого капсида бактериофага $\phi\text{H}29$, выражающихся в двукратно большей его жесткости в продольном направлении по отношению к поперечному направлению, что может быть вызвано необходимостью противостоять дегидратации, осмотическому давлению и механическому напряжению, создаваемому компактизированной молекулой ДНК [45]. Выявлены различия в жесткости полого и содержащего ДНК вириона. Количественно определенное давление внутри капсида фага $\phi\text{H}29$, соответствовало 40 атмосферам, что согласуется с предсказаниями теоретических расчетов [46].

Перспективным направлением является использование АСМ для создания миниатюрных тест-систем для диагностики различных заболеваний - биочипов, в которых используется принцип молекулярного узнавания. Так авторами [47] продемонстрирована принципиальная возможность совместного использования технологии микроконтактной печати (МКП) и АСМ для диагностических целей на примере детекции *Chlamydia trachomatis* в пробах биологических образцов. МКП использовалась для создания микроструктурированных сенсорных покрытий из поликлональных противохламидийных IgG на которых происходила селективная адсорбция частиц *C. trachomatis*. Использование АСМ позволило не только охарактеризовать несколько морфотипов возбудителя, но и анализировать укладку антигенов на подложке. Аналогичным образом иммобилизовывались и идентифицировались отдельные молекулы протеазорезистентного прионного

белка PrP²⁷⁻³⁰, что указывает на возможность проведения ранней диагностики заболеваний прионной этиологии.

Заключение

С момента своего возникновения, методы атомно-силовой микроскопии смогли прочно занять важное место в ряду традиционных исследовательских подходов к изучению биологических объектов. Гибкость методик АСМ позволяет находить все новые и новые приложения в биохимии, молекулярной биологии и биотехнологии. Бесспорны преимущества использования АСМ и в микробиологических исследованиях – нанометровая визуализация в воздушной и жидкой средах в сочетании с качественно новой информацией о механических и поверхностных свойствах, предоставляемой при использовании спектроскопических методик, делают его неоценимым в решении ряда задач. К настоящему времени АСМ успешно применяется для диагностики и быстрой количественной оценки вирусных частиц, идентификации микроорганизмов, исследования влияния различных веществ на жизнедеятельность клеток, визуализации и контроля образования специфических комплексов, контроля размеров, структуры и стабильности различных наноструктур, используемых для доставки лекарственных средств, визуализации единичных биомолекул и многих других, чрезвычайно разнообразных задач.

Отмечая достоинства, необходимо упомянуть и о недостатках метода, к которым относят ограниченный размер поля сканирования (в лучшем случае составляет порядка 150×150 мкм), небольшой перепад высот (несколько микрометров) изучаемой поверхности и низкую, по сравнению с растровым электронным микроскопом, скорость сканирования, которая на сегодняшний день достигла 10 кадров в секунду. Совершенно очевидно, что совершенствование существующих и разработка новых методик сканирующей микроскопии позволит уже в ближайшем будущем следить за трансформациями, происходящими в биосистемах на атомарном разрешении и в режиме реального времени.

10.04.2014

Работа выполнена при поддержке Правительства Оренбургской области совместно с Российским фондом фундаментальных исследований (проект №13-04-97054) и Министерства образования и науки РФ в рамках выполнения базовой части госзаказа (проект №148) с применением оборудования ЦКП ИМНТ ОГУ

Список литературы:

- Allison D.P., Mortensen N.P., Sullivan C.J., Doktycz M.J. Atomic force microscopy of biological samples // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. – 2010. – V. 2. – №6. – P. 618–634. – doi:10.1002/wnan.104
- Kai-Chih Chang, Yu-Wei Chiang, Chin-Hao Yang, Je-Wen Liou Atomic force microscopy in biology and biomedicine // *Tzu Chi Medical Journal*. – 2012. – V. 24. – №4. – P. 162–169.
- Goldsbury C.S., Scheuring S., Kreplak L. Introduction to atomic force microscopy (AFM) in biology // *Current Protocols in Protein Science*. – 2009. – V. 17. – №7. – P. 1–19. – doi:10.1002/0471140864.ps1707s58
- Цинберг М.Б., Дерябин Д.Г., Денисова И.В., Никиян А.Н. Ростовые и морфологические характеристики производственных штаммов *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* при использовании гидролизатно-молочной и гидролизатно-соевой сред // *Антибиотики и химиотерапия*. – 2003. – Т. 48. – №12. – С. 9–13.
- Васильченко А.С., Яруллина Д.Р., Никиян А.Н., Тесля А.В. Морфофункциональные характеристики бактерий *Bacillus cereus* на различных этапах жизненного цикла // *Вестник Оренбургского государственного университета*. – 2012. – №10. – С. 66–71.
- Олюнина Л.Н., Мацкова Ю.А., Гончарова Т.А., Гущина Ю.Ю. Оценка терморезистентности *Azotobacter chroococcum* методом атомно-силовой микроскопии // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2009. – Т. 45. – №1. – С. 45–50.
- Gaboriaud F., Baillet S., Dague E., Jorand F. Surface structure and nanomechanical properties of *Shewanella putrefaciens* bacteria at two pH values (4 and 10) determined by atomic force microscopy // *Journal of bacteriology*. – 2005. – V. 187. – №11. – P. 3864–3868.
- Nikiyan H., Vasilchenko A., Deryabin D. Humidity-dependent bacterial cells functional morphometry investigations using atomic force microscope // *International Journal of Microbiology*. – 2010. – doi:10.1155/2010/704170
- Mejias Carpio I.E., Santos C.M., Wei X., Rodrigues D.F. Toxicity of a polymer-graphene oxide composite against bacterial planktonic cells, biofilms, and mammalian cells // *Nanoscale*. – 2012. – V. 4. – №15. – P. 4746–56. – doi:10.1039/c2nr30774j
- Esfandiary E., Valiani A., Hashemibeni B., Moradi I., Narimani M. The evaluation of toxicity of carbon nanotubes on the human adipose-derived-stem cells in-vitro // *Advanced Biomedical Research*. – 2014. – V. 3. – doi:10.4103/2277-9175.125729
- Дерябин Д.Г., Васильченко А.С., Алешина Е.С., Тлягулова А.С., Никиян А.Н. Исследование взаимодействия углеродных наноматериалов с клетками *Escherichia coli* методом атомно-силовой микроскопии // *Российские нанотехнологии*. – 2010. – Т. 5. – №11–12. – С. 103–108.
- Nikiyan H., Vasilchenko A., Deryabin D. AFM investigations of various disturbing factors on bacterial cells // *Microscopy: science, technology, applications and education (Microscopy book series – ISBN (13). 978-84-614-6189-9)*. – 2010. – №4. – V. 1. – P.523–529.
- Liu S., Wei L., Hao L., Fang N., Chang M.W., Xu R., Yang Y., Chen Y. Sharper and faster “Nano Darts” kill more bacteria: a study of antibacterial activity of individually dispersed pristine single-walled carbon nanotube // *ACS Nano*. – 2009. – V. 3. – №12. – P. 3891–3902.
- Liu S., Ng A.K., Xu R., Wei J., Tan C.M., Yang Y., Chen Y. Antibacterial action of dispersed single-walled carbon nanotubes on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* investigated by atomic force microscopy // *Nanoscale*. – 2010. – V. 2. – №12. – P. 2744–2750. – doi:10.1039/c0nr00441c
- Ahmed F., Santos C.M., Vergara R.A., Tria M.C., Advincula R., Rodrigues D.F. Antimicrobial applications of electroactive PVK-SWNT nanocomposites // *Environmental Science and Technology*. – 2012. – V. 46. – №3. – P. 1804–1810. – doi:10.1021/es202374e
- Longo G., Kasas S. Effects of antibacterial agents and drugs monitored by atomic force microscopy // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. – 2014. – V. 6. – №3. – P. 230–244. – doi:10.1002/wnan.1258
- Дерябин Д.Г., Васильченко А.С., Никиян А.Н. Исследование воздействия ампициллина на морфологические и механические свойства клеток *Escherichia coli* и *Bacillus cereus* с использованием метода атомно-силовой микроскопии // *Антибиотики и химиотерапия*. – 2011. – Т. 56. – №7–8. – С. 7–12.
- Perry C.S., Weatherly M., Beale T., Randriamahafa A. Atomic force microscopy study of the antimicrobial activity of aqueous garlic versus ampicillin against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. – 2009. – V. 89. – №6. – P. 958–964. – doi:10.1002/jsfa.3538
- Yang L., Wang K., Tan W., He X., Jin R., Li J., Li H. Atomic force microscopy study of different effects of natural and semisynthetic β -lactam on the cell envelope of *Escherichia coli* // *Anal. Chem*. – 2006. – V. 78. – P. 7341–7345.
- Mohan K.V.K., Rao S.S., Atreya C.D. Evaluation of antimicrobial peptides as novel bactericidal agents for room temperature-stored platelets // *Transfusion*. – 2010. – V. 50. – P. 166–173.
- Vasilchenko A.S., Nikiyan H.N., Deryabin D.G. Atomic force microscopy study of magainin 2 versus human platelet extract action on *Escherichia coli* and *Bacillus cereus* // *Journal of biological research*. – 2013. – №19. – P. 3–9.
- Meincken M., Holroyd D.L., Rautenbach M. Atomic force microscopy study of the effect of antimicrobial peptides on the cell envelope of *Escherichia coli* // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2005. – V. 49. – № 10. – P. 4085–4092.
- Филонов А., Яминский И. Обработка и анализ данных в сканирующей зондовой микроскопии: алгоритмы и методы // *Наноиндустрия*. – 2007. – №2. – С. 32–34.
- Alsteens D., Verbelen C., Dague E., Raze D., Baulard A., Dufrene Y. Organization of the mycobacterial cell wall: a nanoscale view // *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*. – 2008. – V. 456. – № 1. – P. 117–125.
- Gilbert Y., Deghorain M., Wang L., Xu B., Pollheimer P.D., Gruber H.J., Errington J., Hallet B., Haulot X., Verbelen C., Hols P., Dufrene Y. Single-molecule force spectroscopy and imaging of the vancomycin/d-Ala-d-Ala interaction // *Nano Letters*. – 2007. – V. 7. – №3. – P. 796–801.
- Ramos-Vara J.A. Technical aspects of immunohistochemistry // *Veterinary pathology*. – 2005. – V.42. – №4. – P. 405–426.
- Kuo J. Electron microscopy: methods and protocols. Humana Press. – 2007. – 608 p. – ISSN 1064-3745.
- Kuznetsov V.Y., Ivanov Y.D., Archakov A.I. Atomic force microscopy revelation of molecular complexes in the multiprotein cytochrome P450 2B4-containing system // *Proteomics*. – 2004. – V. 4. – №8. – P. 2390–2396.
- Способ детекции токсичных белков на основе сканирующей зондовой микроскопии / В. А. Быков [и др.]; ЗАО "НТ-МДТ". – № 2003121587/13 ; Заявл. 16.07.2003 ; Опубл. 10.01.2006 Патент 2267787 Российская Федерация, МКИ G01N 33/577.
- Малюченко, Н.В. Детекция иммунных комплексов с помощью атомно-силовой микроскопии // *Биофизика*. – 2004. – Т. 49. – № 6. – С. 1008–1014.

31. Dykman L.A., Staroverov S.A., Bogatyrev V.A., Shchyogolev S.Yu. Gold nanoparticles as an antigen carrier and as an adjuvant. In: *Gold Nanoparticles: Properties, Characterization and Fabrication*, Ed. by Chow P.E. – New York: Nova Science Publishers. – 2010. – Ch. 2. – P. 59–88.
32. Tatlybaeva E.B., Nikiyan H.N., Vasilchenko A.S., Deryabin D.G. Atomic force microscopy recognition of protein A on *Staphylococcus aureus* cell surfaces by labeling with IgG-Au conjugates // *Beilstein J. Nanotechnol.* – 2013. – №4. – P. 743–749.
33. Nordstrom M., Keller S., Lillemose M., Johansson A., Dohn S., Haefliger D., Blagoi G., Havsteen-Jakobsen M., Boisen A. SU-8 cantilevers for bio/chemical sensing; Fabrication, characterisation and development of novel read-out methods // *Sensors.* – 2008. – V. 8. – №3. – P. 1595–1612.
34. Steffens C., Leite F.L., Bueno C.C., Manzoli A., Herrmann P.S. Atomic force microscopy as a tool applied to nano/biosensors // *Sensors.* – 2012. – V. 12. – №6. – P. 8278–8300. – doi:10.3390/s120608278
35. Сафенкова И.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Применение атомно-силовой микроскопии для характеристики единичных межмолекулярных взаимодействий // *Успехи биологической химии.* – 2012. – Т. 52. – С. 281–314.
36. Fuhrmann A., Schoening J.C., Anselmetti D., Staiger D., Ros R. Quantitative analysis of single-molecule RNA-protein interaction // *Biophysical Journal.* – 2009. – V. 96. – №12. – P. 5030–5039.
37. Lynch S., Baker H., Byker S.G., Zhou D., Sinniah K. Single molecule force spectroscopy on G-quadruplex DNA // *Chemistry a European journal.* – 2009. – V. 15. – №33. – P. 8113–8116.
38. Eckel R., Wilking S.D., Becker A., Sewald N., Ros R., Anselmetti D. Single-molecule experiments in synthetic biology: an approach to the affinity ranking of DNA-binding peptides // *Angewandte chemie international edition.* – 2005. – V. 44. – №25. – P. 3921–3924.
39. Porter-Peden L., Kamper S.G., Wal M.V., Blankespoor R., Sinniah K. Estimating kinetic and thermodynamic parameters from single molecule enzyme-inhibitor interactions // *Langmuir.* – 2008. – V. 24. – №20. – P. 11556–11561.
40. Yew Z.T., Olmsted P.D., Paci E. Free energy landscapes of proteins: insights from mechanical probes // *Single-Molecule Biophysics.* – 2012. – V. 146. – P. 395–417.
41. Kuznetsov Y.G., Daijogo S., Zhou J., Semler B.L., McPherson A. Atomic force microscopy analysis of icosahedral virus RNA // *Journal of molecular biology.* – 2005. – V. 347. – №1. – P. 41–52.
42. Kuznetsov Y.G., McPherson A. Atomic force microscopy in imaging of viruses and virus-infected cells // *Microbiology and molecular biology reviews.* – 2011. – V. 75. – №2. – P. 268–85. – doi:10.1128/MMBR.00041-10
43. Porter M.D., Driskell J.D., Kwarta K.M., Lipert R.J., Neill J.D., Ridpath J.F. Detection of viruses: atomic force microscopy and surface enhanced Raman spectroscopy // *Developments in biologicals.* – 2006. – V. 126. – P. 31–39.
44. Шибанова А.С., Саватеев М.Н., Малоченко Н.В., Трофимов Д.Ю., Агапов И.И. Новый метод количественной оценки вирусных частиц // *Биомедицинская химия.* – 2009. – Т.55. – Вып.5. – С. 610–620.
45. Carrasco C., Luque A., Hernando-Perez M., Miranda R., Carrascosa J.L., Serena P.A., de Ridder M., Arvind R., Gomez-Herrero J., Schaap I.A.T., Reguera D., de Pablo P.J. Built-in mechanical stress in viral shells // *Biophysical Journal.* – 2011. – V. 100. – №4. – P. 1100–1108.
46. Hernando-Perez M., Miranda R., Aznar M., Carrascosa J.L., Schaap I.A.T., Reguera D., Pablo P.J. Direct measurement of phage phi29 stiffness provides evidence of internal pressure // *Small.* – 2012. – V. 8. – №15. – P. 2366–2370. – doi:10.1002/sml.201200664
47. Полещук Н., Асташонок А., Рубаник Л., Капитулец С., Жавнерко Г., Парибок И., Фарния П., Яминский И. Нанотехнологические подходы для диагностики бактериально-вирусных инфекций // *Наноиндустрия.* – 2012. – Вып. 35. – С. 48–54.

Сведения об авторах:

Никиян Айк Николаевич, доцент кафедры биофизики и физики конденсированного состояния Оренбургского государственного университета, кандидат физико-математических наук, доцент
e-mail: nikiyan@yahoo.com

Татлыбаева Елена Батыровна, аспирант кафедры микробиологии Оренбургского государственного университета, e-mail: tatlybaeva@mail.ru
460018, г. Оренбург, пр-т Победы, 13