

14.06

## Использование микроструктурированных подложек, полученных методом ионной имплантации, для подсчета бактерий

© В.Г. Евтюгин,<sup>1,2</sup> А.М. Рогов,<sup>1,2</sup> Л.Р. Валеева,<sup>1</sup> В.И. Нуждин,<sup>2</sup> А.Л. Степанов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Казанский федеральный университет,  
420008 Казань, Россия

<sup>2</sup> Казанский физико-технический институт им. Е.К. Завойского,  
Федеральный исследовательский центр — Казанский научный центр РАН,  
420029 Казань, Россия  
e-mail: vevtugyn@gmail.com

Поступило в Редакцию 27 декабря 2019 г.

В окончательной редакции 27 декабря 2019 г.

Принято к публикации 17 февраля 2020 г.

Описан новый технологический подход для создания методом ионной имплантации наноструктурированных подложек для визуальной характеристики сверхмалых биологических объектов и микроорганизмов. При использовании имплантации ионами аргона покровных силикатных стекол через маски в виде проволочных медных сеток на их поверхности были сформированы периодические микроструктуры в виде решеток с размерами ячеек  $50 \times 50 \mu\text{m}$ . Апробация новых типов подложек была проведена на примере осажденных на них бактерий родов *Bacillus* и *Staphylococcus* методами сканирующей электронной микроскопии и энергодисперсионного анализа, а также атомно-силовой микроскопии.

**Ключевые слова:** микроструктурированные подложки, ионная имплантация, аналитическая микроскопия, микроорганизмы.

DOI: 10.21883/JTF.2020.09.49691.430-19

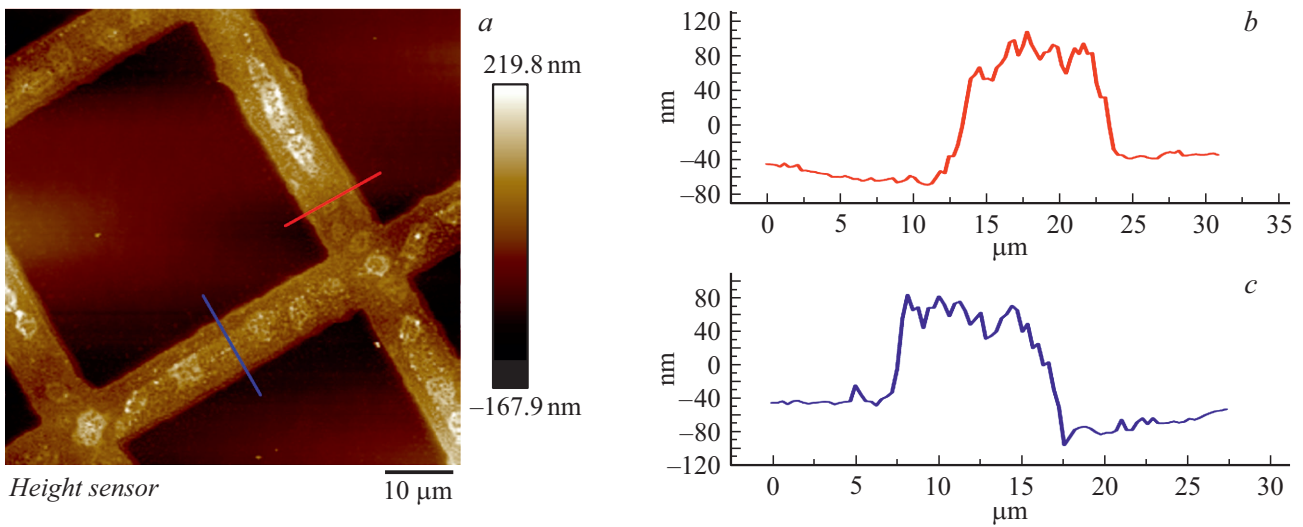
### Введение

Микро- и наноструктурированные подложки могут быть применены для проведения счетного статистического анализа, а также для исследований в биомедицине при секвенировании, разделении, обнаружении, идентификации, количественном и структурном анализе микрообъектов таких, как клеточные популяции (кровь, клеточные культуры), микроорганизмы, вирусы и др.

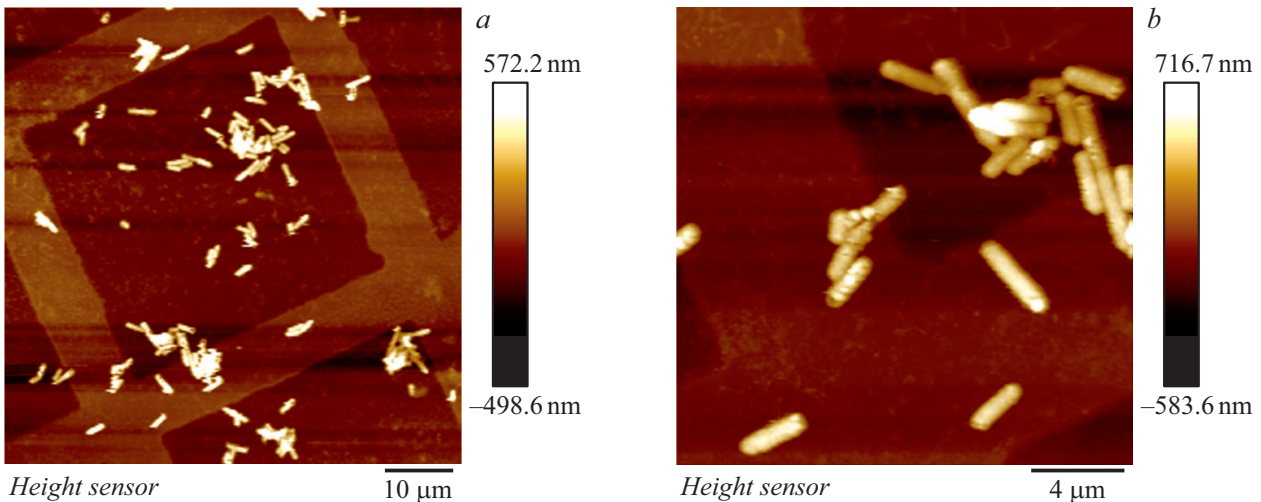
Одним из возможных решений проблем своевременного выявления и последующей локализации распространения, а также диагностики различного вида инфекционных заболеваний является современная оперативная диагностика разнообразных биообъектов. Для этого все чаще привлекаются современные методы с использованием высокоразрешающей электронной и зондовой микроскопии. Быстрое развитие методов микроскопии происходит благодаря появлению новой приборной базы и использованию современных технологических достижений при разработке новых композитных материалов, полученных на основе исследования их химических и физических свойств [1]. Создание принципиально новых контролирующих и анализирующих систем, а также разработка новых методов и методик на их основе могут быть успешно использованы в диагностике и характеристике биологического материала предельно малого размера (бактериальных клеток и вирусов). Поэтому появляются возможности, ранее не применявшиеся на практике, для их подсчета и статистической обработки, анализа формы и т.д. Все это позволяет значительно

ускорить и упростить диагностику, а также анализ патогенного и условно патогенного биоматериала, что приближает переход к персонализированной медицине и улучшению здравоохранения.

Целью настоящей работы является разработка, создание и проверка специфических регулярных микроструктурированных подложек (устройств) для осаждения на них и проведения подсчета сверхмалых биологических микрообъектов, в частности бактерий, методами высокоразрешающей электронной и зондовой микроскопии. Для создания таких биологических устройств предлагается применить технологию ионной имплантации, в частности, модификации и контролируемого структурирования поверхности различных подложек. Ионная имплантация в настоящее время является одной из базовых методик, применяющихся в промышленной полупроводниковой микроэлектронике для создания различных типов оптоэлектронных нано- и микроустройств [2]. Ранее была продемонстрирована возможность создания периодических поверхностных оптических дифракционных структур методами имплантации различными ионами через маски на таких материалах, как кремний [3], кварцевое стекло [4–6], полиметилметакрилат [7], алмаз [8]. Известны также работы по применению ионного травления при имплантации для контролируемого создания профилей, трехмерных объектов и микроструктур на поверхности металлов и полупроводников [9], к которым относится, в частности, технология травления фокусируемым ионным пучком в вакууме [10].



**Рис. 1.** АСМ-изображение (a) и профили стенок ячеек поверхностной решетки (b, c), измеренные по выделенным на фрагменте (a) направлениям.



**Рис. 2.** АСМ-изображения в различных масштабах отдельной ячейки поверхностной решетки с нанесенными на нее бактериями *Bacillus subtilis*: a — суспензия клеток, осажденная на подложку, b — отдельные клетки бактерий в ячейке и на ребре сетки.

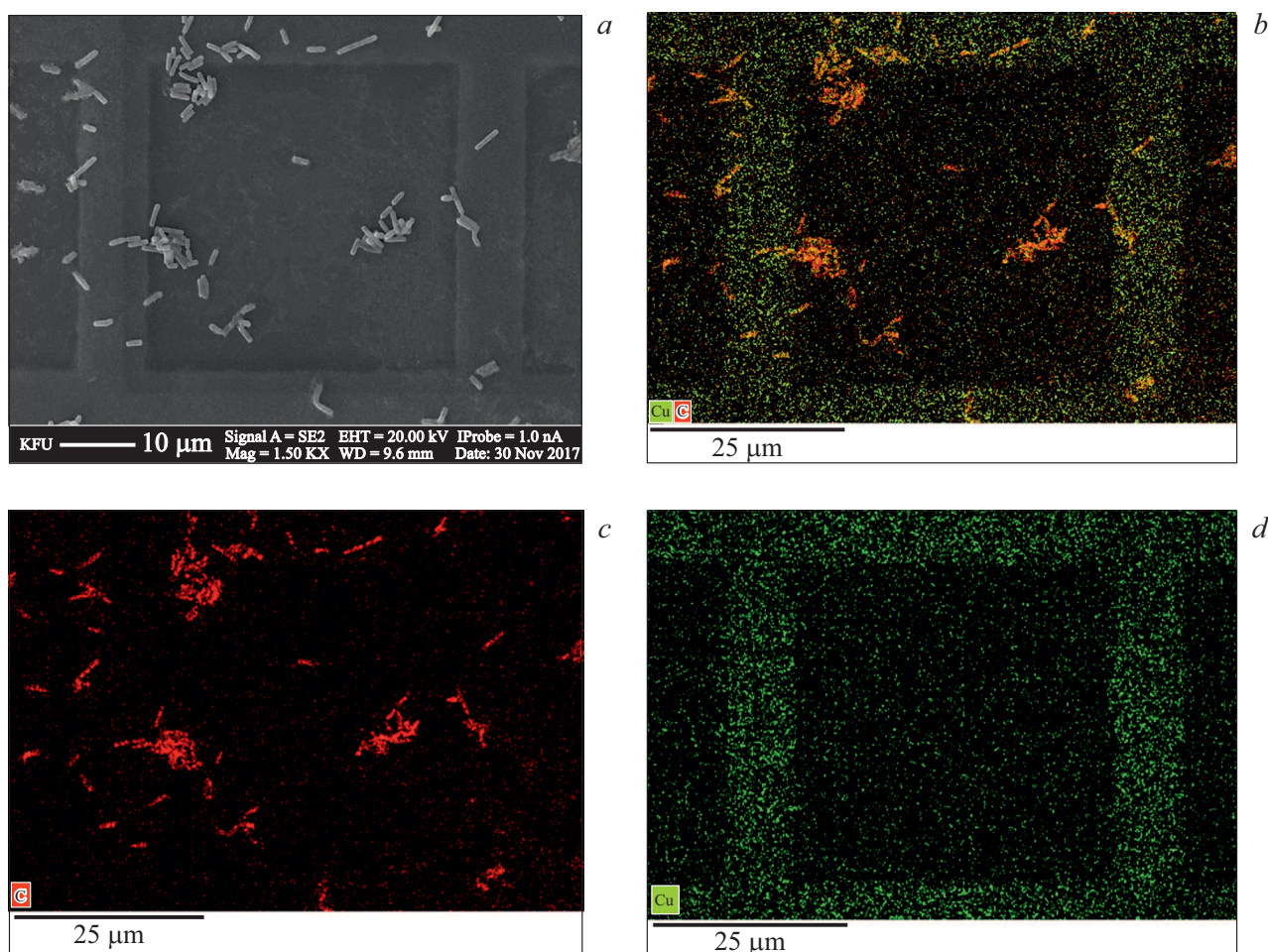
В настоящей работе впервые предполагается использовать имплантацию ионами инертного газа силикатного стекла через маску для формирования поверхностных микроструктур, применимых для использования в анализе сверхмалых биологических объектов.

## 1. Методика эксперимента

Имплантация однозарядными ионами аргона (энергия  $E = 40 \text{ keV}$ , доза облучения  $D = 3.1 \cdot 10^{17} \text{ ion/cm}^2$  и плотность тока в ионном пучке  $J = 20 \text{ mA/cm}^2$ ) проводилась на ионнолучевом ускорителе ИЛУ-3 через проволочную медную маску-сетку в покровные силикатные стекла ( $20 \times 20 \text{ mm}$ , толщина  $170 \mu\text{m}$ ).

Морфологию структурируемой поверхности имплантированного стекла с нанесенными микроорганизмами

исследовали методом растровой электронной микроскопии (РЭМ), при этом использовался автоэмиссионный сканирующий электронный микроскоп высокого разрешения Merlin (Carl Zeiss) при низком ускоряющем напряжении  $5 \text{ keV}$  в режиме детектирования вторичных электронов. Метод атомно-силовой микроскопии (АСМ; атомно-силовой микроскоп Dimension Fast Scan (Bruker)) также был применен для исследования морфологии структурируемой поверхности при использовании с зондами Bruker ScanAssyst Air, радиус закругления  $\sim 5 \text{ nm}$  и жесткость  $0.4 \text{ N/m}$ . Элементный анализ проводился с помощью энергодисперсионного (ЭДС) спектрометра X-Max (Oxford Instruments), используемого в комплексе с РЭМ при ускоряющем напряжении  $20 \text{ keV}$ .



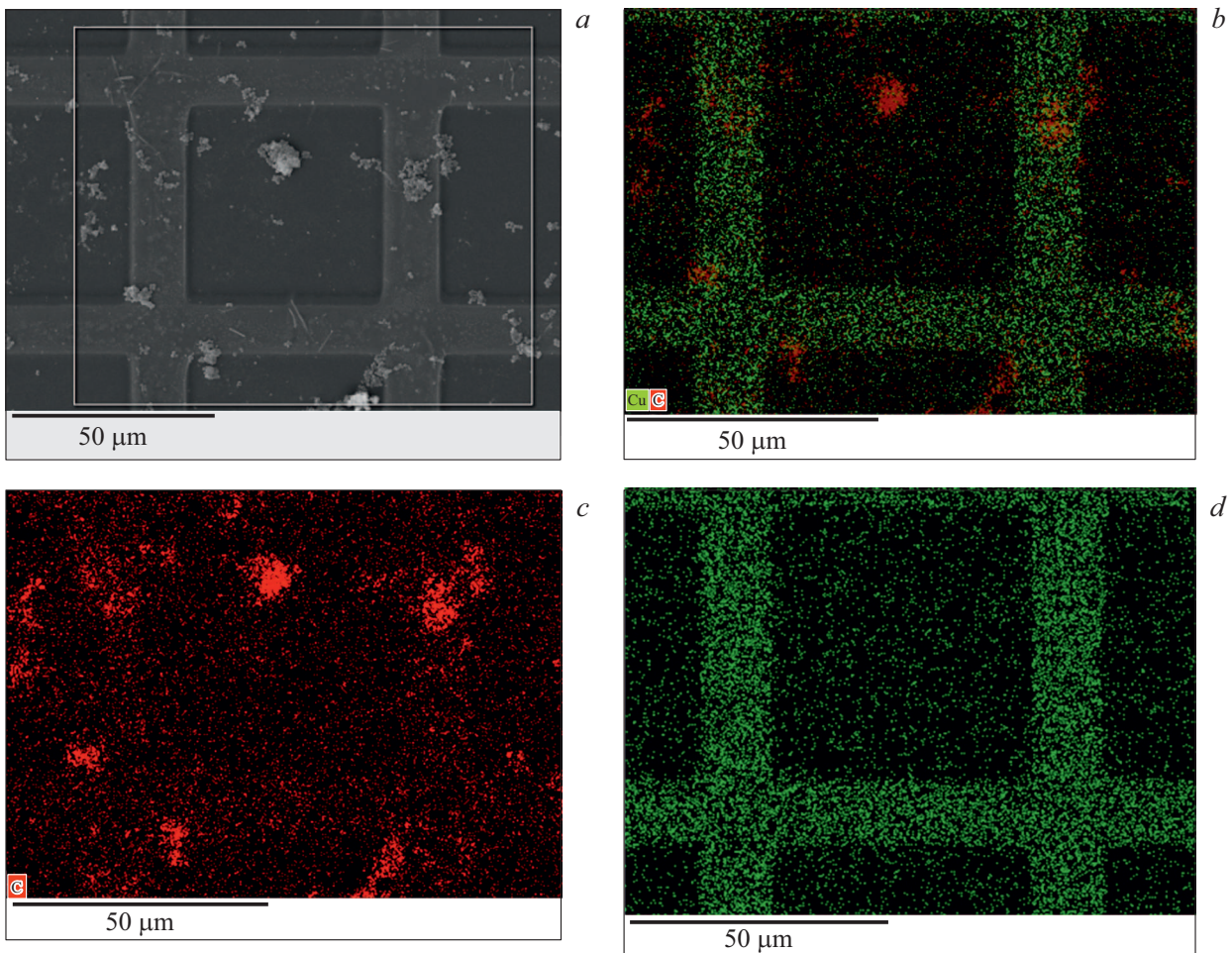
**Рис. 3.** РЭМ-изображение отдельной ячейки поверхностной решетки (а) с нанесенными на нее бактериями *Bacillus subtilis*, соответствующие ей ЭДС-карты для различных химических элементов: углерод + медь (b), углерод (c), медь (d).

В качестве биологического материала для осаждения на предлагаемые подложки использовали штаммы бактерий *Bacillus subtilis* MG4 и *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach (ATCC 2592) из коллекции микроорганизмов лаборатории биосинтеза и биоинженерии ферментов Института фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета. Культивирование бактерий проводили на жидких питательных средах LB (Luria-Bertani): триптон — 10 г/л, дрожжевой экстракт — 5 г/л, хлорид натрия NaCl — 5 г/л. Культивирование проводили при температуре 37°C, при перемешивании 200–250 rpm в течение 16–18 h. Впоследствии суспензия микроорганизмов осаждалась центрифугированием (5000 rpm, центрифуга Biosan), осадок ресуспендировали в 1%-глютаровом альдегиде (EM grade, Sigma-Aldrich) и выдерживали в течение 18 h для прохождения химической фиксации. После процедуры химической фиксации микроорганизмы осаждали центрифугированием и отмывали в фосфатном буфере, далее проводилось обезвоживание в этиловом спирте (50–96%). Из 96%-спирта суспензия осаждалась, наносилась на микроструктурированную ионной имплан-

тацией стеклянную подложку. Для проведения РЭМ и ЭДС-анализа на поверхность подложки с бактериями наносился проводящий слой золото/палладий (Quorum Q-150T ES) толщиной 10–15 nm.

## 2. Результаты и их обсуждение

Ионная имплантация является процессом внедрения ускоренных ионов в облучаемую матрицу на определенную глубину в зависимости от энергии. Процесс столкновения ионов с поверхностью может сопровождаться ее частичным распылением. Характер распыления зависит от ряда факторов: энергия ускорения, масса иона, плотность вещества мишени и т.д. Если проводится имплантация материала через маску, то на его поверхности образуются облученные области, соседствующие с необлученными участками. В определенных случаях, например при высокодозовой имплантации монокристаллических подложек алмаза ионами бора [7], облученные участки превращаются в пористый графит, которые распухают и возвышаются над исходным уров-



**Рис. 4.** РЭМ-изображение отдельной ячейки поверхностной решетки (*a*) с нанесенными на нее бактериями *Staphylococcus* sp., соответствующие ей ЭДС-карты для различных химических элементов: углерод + медь (*b*), углерод (*c*), медь (*d*).

нем подложки. Напротив, при имплантации кварцевого стекла ионами металлов наблюдалось его распыление и понижение уровня облученного участка относительно поверхности исходной подложки [4,5].

В настоящей работе наблюдение изменения морфологии поверхности силикатного стекла, подвергнутого высокодозовой имплантации ионами аргона через маску, проводилось методом АСМ. На рис. 1, *a* приведено АСМ-изображение микроструктурированной поверхности стекла, которое отображается в виде сетки. Толщина распыленного слоя стекла (глубина ячеек решетки) для использованной дозы облучения составляет 60–80 нм, о чем свидетельствуют приведенные на рис. 1, *b*, *c* профили, измеренные на стенках ячеек. При этом ширина ячейки решетки составляет 50 μm. На рис. 2, *a* показаны АСМ-изображения той же решетки на стеклянной подложке после нанесения на нее бактерий рода *Bacillus*. Хорошо видно, что размерные параметры сформированных структур обеспечивают удобное соотношение для работы с микроорганизмами, в частности бактериями средних (3–5 μm) размеров. Как следует из рис. 2, *b*, часть бактерий осаждается на ребрах решетки, что мо-

жет приводить к некоторой ошибке при статистическом анализе распределения биоматериала по площади. Очевидно, что использование более длительной по времени ионной имплантации приводит к формированию более глубоких ячеек решетки, что может позволить изолировать бактерии, локализованные на ребрах решетки, от поверхности дна ячеек и исключить эти бактерии из общего анализа микроорганизмов.

На рис. 3, *a*, 4, *a* представлено РЭМ-изображение бактерий, нанесенных в небольшой концентрации на микроструктурированную подложку и зарегистрированных на фоне отдельной ячейки. Наблюдается относительно равномерное распределение бактерий по всей поверхности имплантированного стекла, преимущественно в углублениях ячеек. Видно, что размеры клеток являются типичными как для представителей вида *Bacillus subtilis* в вегетативном физиологическом состоянии: длина клеток составляет 3–5 μm, ширина — 1 μm, так и для представителей вида *Staphylococcus aureus*: сферические клетки 2–3 μm в диаметре. Методом ЭДС (рис. 3, 4, *b–d*) показано, что при использовании картирования по химическим элементам за счет детектирования характе-

ристического рентгеновского излучения на поверхности стекла можно наблюдать периодические облученные и необлученные области в виде решетки, соответствующей размеру маски-сетки. В частности, на рис. 3, 4, *d* отчетливо прослеживается распределение меди в виде решетки, которая сформирована при диффузии меди в стекло из нагретой ионным током маски. На другом примере (рис. 3, 4, *c*) показано, как расположение бактерий может регистрироваться по карте распределения углерода. Нанесенные бактерии при этом наблюдаются на фоне медной решетки, на фоне которой достаточно удобно детектировать и анализировать распределение бактерий по сигналу элемента — углерода. Это достигается при наложении ЭДС-карт меди и углерода (рис. 3, *b*). Иными словами, становится возможным оценить плотности упаковки осажденных бактериальных клеток даже при отсутствии различимой визуально профильного геометрического СЭМ-изображения решеточной структуры подложки в детекторе вторичных электронов. Данный подход по ЭДС-картированию может позволить работать не только с малыми концентрациями биологического материала, но также и с их толстыми слоями, поскольку электронный пучок проникает через них достаточно глубоко в объем образца.

## Заключение

Таким образом, в работе продемонстрирована возможность разработки и создания принципиально новых технологических анализирующих систем (в частности микроструктурированных стеклянных подложек), а также заложена основа для разработки новых методик характеристики клеточного материала малого размера на основе АСМ-, РЭМ- и ЭДС-анализа. Использование микроструктурированных подложек с периодической ячеистой структурой, сформированной методом ионной имплантации через маску, позволяет вести подсчеты на сложных сверхмалых биологических микрообъектах. Большая глубина проникновения электронов в органические среды при ЭДС-картировании позволяет получить изображение сформированной решетки даже из-под плотного слоя биологического материала, что существенно расширяет возможности анализа микробных биопленок.

## Благодарности

Автор благодарит Междисциплинарный центр „Аналитическая микроскопия“ КФУ за возможность проведения анализов методами атомно-силовой и сканирующей электронной микроскопии.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## Список литературы

- [1] Альперин П.М. Камеры счетные. Большая медицинская энциклопедия. Т. 12. 2-е изд. М.: Советская энциклопедия, 1959. С. 57–65.
- [2] Stepanov A.L. Ion implantation synthesis and optics of metal nanoparticles. Mauritius: Lambert Acad. Publ., 2018. 437 p.
- [3] Azimi S., Breese M.B.H., Dang Z.Y., Yan Y., Ow Y.S., Bettiol A.A. // J. Micromech. Microeng. 2012. Vol. 22. P. 15015.
- [4] Stepanov A.L., Galyautdinov M.E., Evlyukhin A.B., Nuzhdin V.I., Valeev V.F., Osin Y.N., Kiyani R., Kavetsky T.S., Chichkov B.N. // Appl. Phys. A. 2013. Vol. 111. P. 261.
- [5] Can-Uc B., Rangel-Rojo R., Marquez H., Rodriguez-Fernandez L., Oliver A. // Opt. Express. 2015. Vol. 23. N 3. P. 3176.
- [6] Wang J., Mu X., Wang G., Liu C. // Opt. Mater. 2017. Vol. 73. P. 466.
- [7] Нуждин В.И., Валеев В.Ф., Галютдинов М.Ф., Осин Ю.Н., Степанов А.Л. // Квант. электрон. 2018. Т. 48. № 1. С. 82.
- [8] Степанов А.Л., Нуждин В.И., Галютдинов М.Ф., Курбатова Н.В., Валеев В.Ф., Воробьев В.В., Осин Ю.Н. // Письма в ЖТФ. 2017. Т. 43. Вып. 2. С. 38.
- [9] Azimi S., Breese M.B.H., Dang Z.Y., Yan Y., Ow Y.S., Bettiol A.A. // J. Micromech. Microeng. 2012. Vol. 22. P. 15015.
- [10] Atiqah N., Jaafar I.H., Ali M.Y., Asfana B. // Adv. Mater. Res. 2012. Vol. 576. P. 507.