

ИОННАЯ ИМПЛАНТАЦИЯ КАК МЕТОД СОЗДАНИЯ МИКРОСТРУКТУРИРОВАННЫХ ПОДЛОЖЕК ДЛЯ ПОДСЧЕТА БАКТЕРИЙ

В.Г. Евтюгин^{1), 2)}, А.М. Рогов^{1), 2)}, Л.Р. Валеева¹⁾, В.В. Сальников¹⁾,
Ю.Н. Осин^{1), 2)}, В.Ф. Валеев²⁾, В.И. Нuzhdin²⁾, А.Л. Степанов²⁾

¹⁾Казанский федеральный университет, ул. Кремлевская 18, 420008 Казань, Россия

²⁾Казанский физико-технический институт им. Завойского ФИЦ КазНЦ РАН,
420029 Казань, Россия, vevtugyn@gmail.com, alexeyrogov111@gmail.com,
nuzhdin@kfti.knc.ru, valeev@kfti.knc.ru, aanstep@gmail.com

В работе представлен новый подход для создания методом ионной имплантации микроструктурированных подложек для проведения статистического анализа и визуальной характеристики малых биологических объектов и микроорганизмов. При использовании имплантации ионами аргона силикатных стекол через поверхностные маски в виде проволочных сеток были сформированы поверхностные периодические микроструктуры в виде решеток с размерами ячеек 50×50 мкм и глубиной 50 нм. Апробация новых типов подложек была проведена методами, сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), атомно-силовой микроскопии (АСМ), а также энергодисперсионного анализа (ЭДС) на примере осажденных на них бактерий рода *Bacillus*.

Ключевые слова: наноструктурированные подложки; ионная имплантация; микроскопия; микроорганизмы.

ION IMPLANTATION AS A METHOD FOR CREATING MICROSTRUCTURED SUBSTRATES FOR BACTERIA COUNTING

V.G. Evtugyn^{1), 2)}, A.M. Rogov^{1), 2)}, L.R. Valeeva¹⁾, V.V. Salnikov¹⁾,
Yu.N. Osin^{1), 2)}, V.F. Valeev²⁾, V.I. Nuzhdin²⁾, A.L. Stepanov²⁾

¹⁾Kazan Federal University, 18 Kremlevskaya Str., 420008 Kazan, Russia

²⁾Kazan Institute of Physics and Technology Zavoisky FTS KazSC RAS, 420029 Kazan, Russia
vevtugyn@gmail.com, alexeyrogov111@gmail.com,
nuzhdin@kfti.knc.ru, valeev@kfti.knc.ru, aanstep@gmail.com

The paper presents a new approach for creating a method of ion implantation of microstructured substrates for statistical analysis and visual characterization of small biological objects and microorganisms. When using implantation with argon ions of silicate glasses through surface masks in the form of wire meshes, surface periodic microstructures were formed in the form of gratings with cell sizes of 50 × 50 μm and a depth of 50 nm. Testing of new types of substrates was carried out using scanning electron microscopy (SEM), atomic force microscopy (AFM), and energy dispersive analysis (EDS) using the example of bacteria of the genus *Bacillus* deposited on them.

Keywords: nanostructured substrates; ion implantation; microscopy; microorganisms.

Введение

Периодические нано- и микроструктурированные материалы могут быть использованы для проведения стандартного счетного статистического анализа, а также для исследования в биологии и медицине при секвенировании, разделении, обнаружении, идентификации, количественном и структурном анализе биологических молекул и микрообъектов таких, как клеточные популяции (кровь, клеточные культуры), микроорганизмы, вирусы и т.д.

Одним из потенциальных решений проблем своевременного выявления и последующей локализации распространения, а также лечения различного вида инфекционных заболеваний является своевременная и оперативная диагностика разнообразных биообъектов. Для этого в последние годы все чаще привлекаются разнообразные методы с использованием высокоразрешающей электронной и зондовой микроскопии. Создание принципиально новых технологических контролирующих и анализирующих систем, а также разработка новых методик на их основе, могут быть использованы в диагностике и характеристике клеточного биологиче-

ского материала предельно малого размера (бактериальных клеток и вирусов). Поэтому появляются возможности, ранее не реализованные на практике, для их подсчета и статистической обработки, анализа формы и т.д.

Целью настоящей работы является создание и апробация специфических регулярных микроструктурированных подложек для обеспечения подсчета биологических микрообъектов методами высокоразрешающей электронной и зондовой микроскопии. Для создания таких биологических устройств предлагается использовать технологию ионной имплантации модификации и контролируемого структурирования поверхности диэлектрических материалов. Ионная имплантация в настоящее время является одной из основных методик, применяемой в промышленной полупроводниковой микроэлектронике для формирования различных типов нано- и микроустройств [1]. Ранее была продемонстрирована возможность создания периодических поверхностных оптических дифракционных структур методами имплантации различными ионами через маски на таких материалах, как кремний [2], кварцевое стекло [3, 4], полиметилме-

такрилат [5], алмаз [6]. В настоящем исследовании впервые предлагается использовать имплантацию ионами инертного газа силикатного стекла через маску для формирования поверхностных наноструктур, пригодных для использования в анализе сверхмалых биологических объектов.

Материалы и методы исследования

Имплантация однозарядными ионами аргона с энергией $E = 40$ кэВ, дозой облучения $D = 3.1 \cdot 10^{17}$ ион/см² и плотностью тока в ионном пучке $J = 20$ мкА/см² через проволоочную медно-никелевую маску-сетку в покровные силикатные стекла (20 x 20 мм, толщина 170 мкм) проводилась на ионно-лучевом ускорителе ИЛУ-3.

Морфология структурируемой поверхности имплантированного стекла с нанесенными микроорганизмами исследовалась на высокоразрешающем сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) Merlin (Carl Zeiss) при низком ускоряющем напряжении 5 кэВ в режиме детектирования вторичных электронов и атомно-силовом микроскопе (АСМ) Dimension FastScan (Bruker) с использованием зондов Bruker ScanAssyst Air с радиусом закругления ~5 нм и жесткостью 0.4 Н/м. Элементный анализ проводился с помощью энергодисперсионного (ЭДС) спектрометра X-Max (Oxford Instruments) на СЭМ при ускоряющем напряжении 20 кэВ.

В качестве биоматериала для осаждения на предлагаемые подложки использовался штамм бактерий *Bacillus subtilis* MG4 из коллекции микроорганизмов Лаборатории биосинтеза и биоинженерии ферментов Института фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета. Культивирование бактерий проводили на жидкой питательной среде LB (Luria-Bertani): триптон – 10 г/л, дрожжевой экстракт – 5 г/л, хлорид натрия NaCl – 5 г/л. Условия культивирования: 37 °С, при перемешивании 200-250 об/мин. в течение 16-18 ч. В последствии суспензия микроорганизмов осаждалась центрифугированием (5000 об./мин., центрифуга Biosan), осадок ресуспендировался в 1% глутаровом альдегиде (EM grade, Sigma-Aldrich) и выдерживался в течение 18 часов для прохождения химической фиксации. После процедуры химической фиксации, микроорганизмы осаждали центрифугированием и отмывали ресуспендированием в фосфатном буфере, далее проводилось обезвоживание в этиловом спирте 50-96%. Из 96% спирта суспензия наносилась на микроструктурированную ионной имплантацией стеклянную подложку. Для проведения СЭМ и ЭДС анализа на поверхность подложки с микроорганизмами наносился проводящий слой золота/палладия (Quorum Q-150T ES) толщиной 10-15 нм.

Результаты и их обсуждение

На первом этапе работы методами АСМ и СЭМ проводились наблюдения изменения морфологии поверхности силикатного стекла, подвергнутого высокодозовой имплантации ионами аргона через маску. На рис. 1а приведено АСМ-изображение наноструктурированной поверхности стекла, которое имеет вид сетки. Толщина распыленного слоя стекла (глубина ячеек решетки) для выбранной

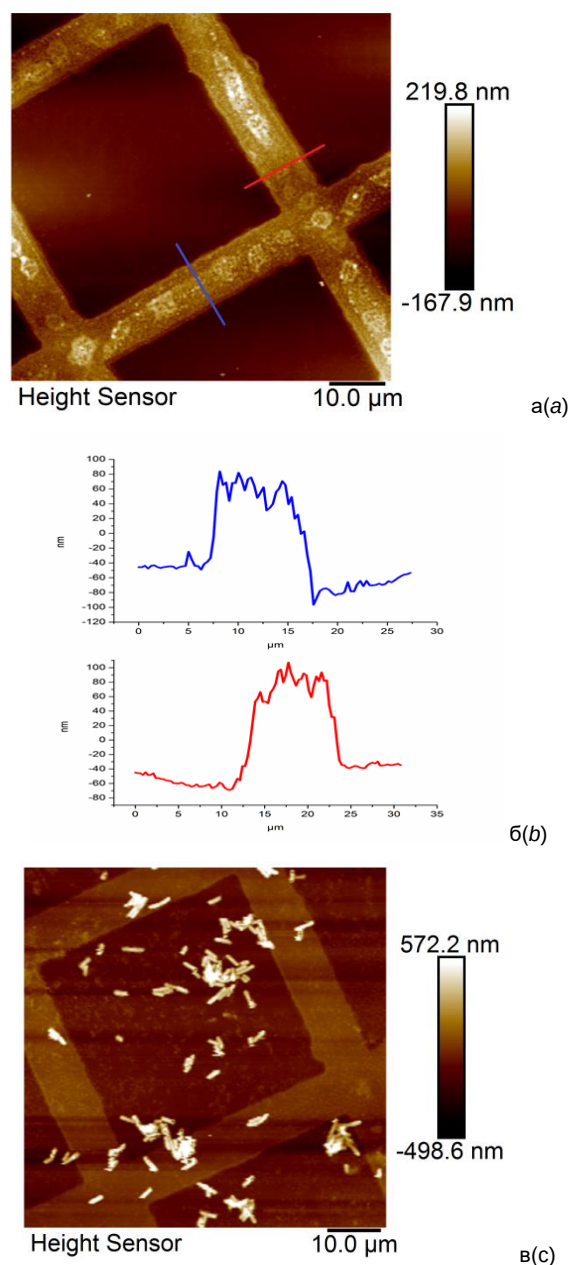


Рис. 1. АСМ-изображение до (а) и после (в) нанесения клеток бактерий и профили стенок ячеек поверхностной решетки (б), измеренные по выделенным на фрагменте (а) направлениям.

Fig. 1. The AFM image before (a) and after (c) deposition of bacterial cells and the profiles of the cell walls of the surface grating (b), measured along the lines selected on the fragment (a)

дозы облучения составляет 60-80 нм, о чем свидетельствуют приведенные на рис. 1б профили. При этом ширина ячейки решетки составляет 50 мкм. На рис. 1в, также приведены АСМ-изображения той же решетки на стеклянной подложке после нанесения на нее бактерий. На следующем этапе эксперимента проводили нанесение бактерий на полученные подложки. Хорошо видно, что размерные параметры сформированных структур обеспечивают удобное соотношение для работы с микроорганизмами, в частности бактериями, средних (3-5

мкм) размеров. Как следует из рис. 1в, часть бактерий осажается на ребрах решетки, что может приводить к некоторой ошибке при их статистической характеристике. Возможно, что использование длительной имплантации позволит сформировать более глубокие ячейки решетки, что позволит изолировать бактерии локализованные на ребрах решетки от поверхности самих ячеек и исключить их из общего анализа микроорганизмов.

На рис. 2а представлено СЭМ-изображение бактерий, нанесенных в небольшой концентрации на наноструктурированную подложку, и регистрированных на фоне отдельной ячейки. Наблюдается относительно равномерное распределение бактерий по всей поверхности имплантированного стекла, преимущественно в углублениях ячеек. Видно, что размеры клеток являются типичными для представителей вида *Bacillus subtilis* в вегетативном физиологическом состоянии: длина клеток составляет 3-5 мкм, ширина 1 мкм. Методом ЭДС (рис. 2б-г) показано, что при использовании картирования по различным химическим элементам можно наблюдать на поверхности стекла периодические облученные и необлученные области в виде решетки, соответствующей размеру маски-сетки. При проведении ЭДС анализа отчетливо прослеживается распределение меди в виде решетки, которая сформирована при диффузии меди в стекло из нагретой ионным током маски. На фоне решетки из атомов меди достаточно удобно регистрировать и анализировать распределение бактерий по карте углерода. При наложении ЭДС-карт меди и углерода (рис. 2г), становится возможным проведение анализа распределения и плотности упаковки бактериальных клеток даже при отсутствии различной профильной геометрической картины решеточной структуры подложки. На другом примере (рис. 2в) показано, как расположение бактерий может регистрироваться по карте распределения углерода. 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 легко.

Заключение

Таким образом, в работе продемонстрирована возможность создания принципиально новых технологических контролируемых и анализирующих систем (микроструктурированных стеклянных подложек), а также заложена база для разработки новых методик характеристики бактериального материала на основе АСМ, СЭМ и ЭДС-анализа.

Использование микроструктурированных подложек с ячейистой структурой, сформированных методом ионной имплантации через маску, позволяет проводить подсчеты на бактериях, а также других биологических микрообъектах. Большая глубина проникновения электронов в органические среды при ЭДС-картировании позволяет получить изображение сформированной решетки даже из-под плотного слоя органического материала, что существенно расширяет возможности анализа микробных биопленок.

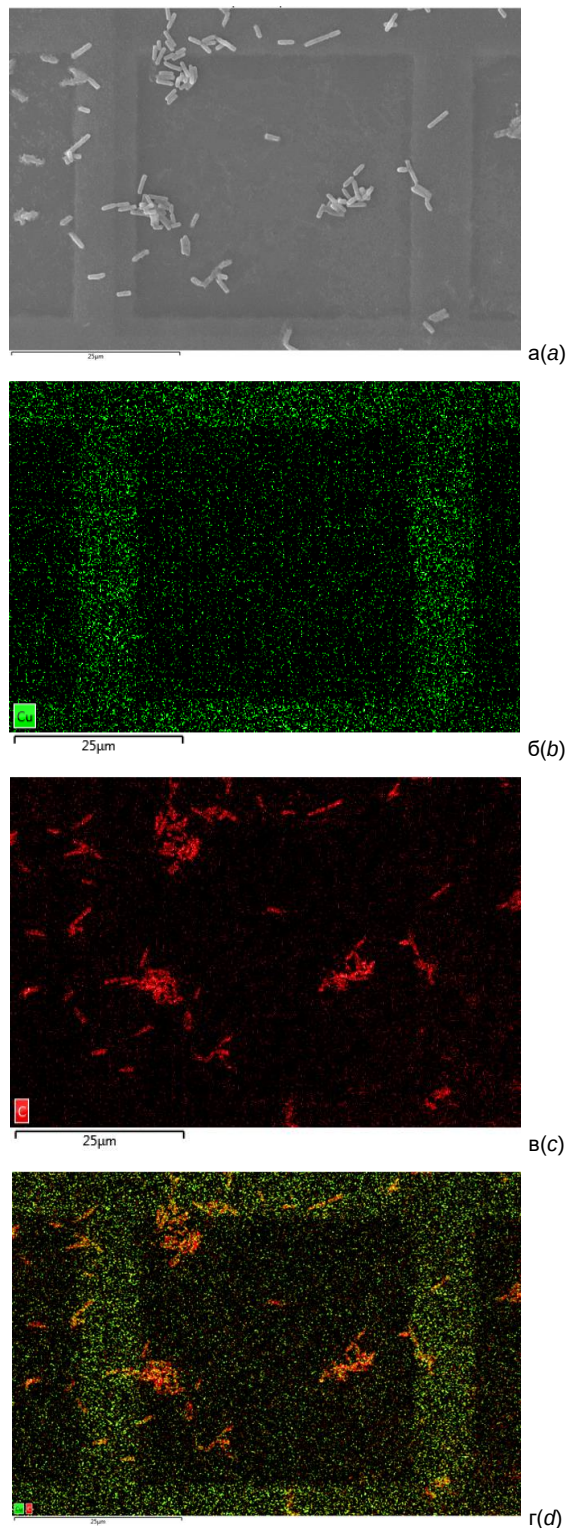


Рис. 2. СЭМ-изображение отдельной ячейки поверхностной решетки (а), с нанесенными на нее бактериями *Bacillus subtilis*, соответствующие ей ЭДС-карты для различных химических элементов: медь (б), углерод (в), углерод + медь (г)

Fig. 2. SEM images of a single cell of the surface lattice (a), with *Bacillus subtilis* bacteria deposited on it, the corresponding EDS maps for various chemical elements: copper (b), carbon (c), carbon + copper (d)

Библиографические ссылки

1. Stepanov A.L. Ion implantation synthesis and optics of metal nanoparticles. Mauritius: LAMBERT Acad. Publ. 2018.
2. Stepanov A.L., Nuzhdin V.I., Valeev V.F., Vorobev V.V., Rogov A.M. Study of silicon surface implanted by silver ions. *Vacuum* 2019; 159: 353-357.
3. Stepanov A.L., Galyautdinov M.E., Evlyukhin A.B., Nuzhdin V.I., Valeev V.F., Osin Y.N., et al. Synthesis of periodic plasmonic microstructures with copper nanoparticles in silica glass by low-energy ion implantation. *Appl. Phys. A*. 2013; 111(1): 261-264.
4. Wang J., Mu X., Wang G., Liu C. Two-dimensional Ag/SiO₂ and Cu/SiO₂ nanocomposite surface-relief grating couplers and their vertical input coupling properties *Opt. Mater.* 2017; 73: 466-472.
5. Нуждин В.И., Валеев В.Ф., Галютдинов М.Ф., Осин Ю.Н., Степанов А.Л. Температурный сенсор на основе полимерной дифракционной решетки с наночастицами серебра. *Квантовая электроника* 2018; 48(1): 82-86.
6. Степанов А.Л., Нуждин В.И., Галютдинов М.Ф., Курбатова Н.В., Валеев В.Ф., Воробьев В.В., и др. Создание дифракционной решетки алмазной подложке имплантацией ионами бора. *Письма в ЖТФ* 2017; 43(2): 38-44.

References

1. Stepanov A.L. Ion implantation synthesis and optics of metal nanoparticles. Mauritius: LAMBERT Acad. Publ. 2018.
2. Stepanov A.L., Nuzhdin V.I., Valeev V.F., Vorobev V.V., Rogov A.M. Study of silicon surface implanted by silver ions. *Vacuum* 2019; 159: 353-357.
3. Stepanov A.L., Galyautdinov M.E., Evlyukhin A.B., Nuzhdin V.I., Valeev V.F., Osin Y.N., et al. Synthesis of periodic plasmonic microstructures with copper nanoparticles in silica glass by low-energy ion implantation. *Appl. Phys. A*. 2013; 111(1): 261-264.
4. Wang J., Mu X., Wang G., Liu C. Two-dimensional Ag/SiO₂ and Cu/SiO₂ nanocomposite surface-relief grating couplers and their vertical input coupling properties *Opt. Mater.* 2017; 73: 466-472.
5. Nuzhdin V.I., Valeev V.F., Galyautdinov M.F., Osin Yu.N., Stepanov A.L. Temperaturnyy sensor na os-nove polimernoy difraktsionnoy reshetki s na-nochastitsami serebra. *Kvantovaya elektronika* 2018; 48(1): 82-86. (In Russian)
6. Stepanov A.L., Nuzhdin V.I., Galyautdinov M.F., Kurbatova N.V., Valeev V.F., Vorob'ev V.V., i dr. Sozdanie difraktsionnoy reshetkina almaznoy podlozhke implantatsieyionami bora. *Pis'ma v ZhTF* 2017; 43(2): 38-44. (In Russian)