

УДК 53.047

МИКРОСТРУКТУРИРОВАННЫЕ ПОДЛОЖКИ ДЛЯ ПОДСЧЕТА БАКТЕРИЙ, СФОРМИРОВАННЫЕ МЕТОДОМ ИОННОЙ ИМПЛАНТАЦИИ ЧЕРЕЗ МАСКУ

© 2019 г. 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. Нуждин², А. Л. Степанов²

¹Казанский федеральный университет, Казань, 420008 Россия

²Казанский физико-технический институт им. Завойского, ФИЦ “КазНЦ” РАН, Казань, 420029 Россия

*E-mail: vevtugyn@gmail.com

Поступила в редакцию 20.01.2019 г.

После доработки 17.02.2019 г.

Принята к публикации 04.03.2019 г.

Представлен новый технологический подход для создания методом ионной имплантации микро-структурированных подложек для проведения статистического анализа и визуальной характеристики сверхмалых биологических объектов и микроорганизмов. При использовании имплантации ионами аргона силикатных стекол через поверхностные маски в виде проволочных сеток были сформированы поверхностные периодические наноструктуры в виде решеток с размерами ячеек 500×500 нм. Аппробация новых типов подложек была проведена на примере осажденных на них бактерий рода *Bacillus* методами атомно-силовой микроскопии и растровой электронной микроскопии в комплексе энергодисперсионным анализом.

Ключевые слова: наноструктурированные подложки, ионная имплантация, аналитическая микроскопия, микроорганизмы.

DOI: 10.1134/S1028096019120082

ВВЕДЕНИЕ

Предлагаемая работа связана с определенными этапами реализации стратегии НТР РФ в плане перехода к персонифицированной медицине. 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 различные методы с использованием высокоразрешающей электронной и зондовой микроскопии. Быстрое развитие микроскопических методов происходит благодаря появлению новой аппаратной базы и использованию современных достижений при

разработке новых композитных материалов, полученных на основе исследованных их химических и физических свойств. Создание принципиально новых технологических контролирующих и анализирующих систем, а также разработка новых методов на их основе, могут быть использованы в диагностике и характеристике клеточного биологического 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. Все это позволяет значительно ускорить диагностику и анализ патогенного и условно патогенного биоматериала, что позволит приблизить переход к персонифицированной медицине для улучшения здравоохранения.

Целью настоящей работы является разработка, создание и апробация специфических регулярных наноструктурированных устройств (подложек) для обеспечения подсчета сверхмалых биологических микрообъектов методами высокоразрешающей электронной и зондовой микроскопии. Для создания таких биологических устройств предлагается использовать технологию ионной имплантации модификации и кон-

тролированного структурирования поверхности диэлектрических материалов. Ионная имплантация в настоящее время является одной из основных методик, применяемой в промышленной полупроводниковой микроэлектронике для формирования 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 использованию 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].

В настоящем исследовании впервые предлагается использовать имплантацию ионами инертного газа силикатного стекла через маску для формирования поверхностных микроструктур, пригодных для использования в анализе сверхмалых биологических объектов.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРМЕНТА

Имплантация однозарядными ионами аргона (энергия $E = 40$ кэВ, доза облучения $D = 3.1 \times 10^{17}$ ион/см² и плотность тока в ионном пучке $J = 20$ мкА/см²) проводилась на ионно-лучевом ускорителе ИЛУ-3 через проволочную медно-никелевую маску-сетку в покровные силикатные стекла (площадь 20×20 мм, толщина 170 мкм).

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 использовали 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: температура 37°C, 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%-глютаровом альдегиде (EMgrade, Sigma-Aldrich) и выдерживался в течение 18 ч 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 наноструктурированную ионной имплантацией стеклянную подложку. Для проведения РЭМ и ЭДС-анализа на поверхность подложки с микроорганизмами наносился проводящий слой золото/палладий (QuorumQ-150TES) толщиной 10–15 нм.

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, таких как энергия ускорения, масса иона, плотность вещества мишени и т.д. Очевидно, что, если проводится имплантация материала через маску, то на его поверхности образуются области облученного и необлученного вещества. Как было показано в случае имплантации монокристаллов алмаза высокими дозами ионами бора [7], облученные участки превращаются в пористый графит, вспухают и возвышаются над исходным уровнем 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 изменения морфологии поверхности силикатного стекла, подвергнутого высокодозовой имплантации ионами аргона через маску, исследовали методом АСМ. На рис. 1а представлено АСМ-изображение наноструктурированной поверхности стекла, которое имеет вид сетки. Толщина распыленного слоя стекла (глубина ячеек решетки) для выбранной дозы облучения составляет 60–80 нм, о чем свидетельствуют приведенные на рис. 1б, в профили. При этом ширина ячейки решетки составляет 500 нм. На рис. 2а показано АСМ-изображение той же решетки на стеклянной подложке после нанесения на нее бактерий. Хорошо видно, что размерные параметры сформированных структур обеспечивают удобное соотношение для работы с микроорганизмами, в частности, бактериями средних

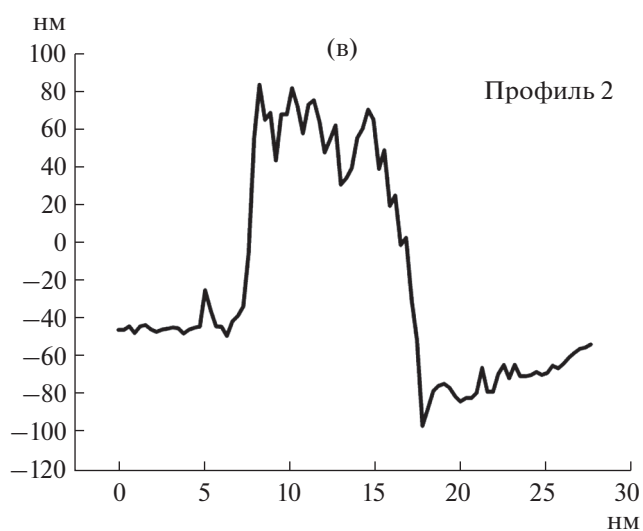
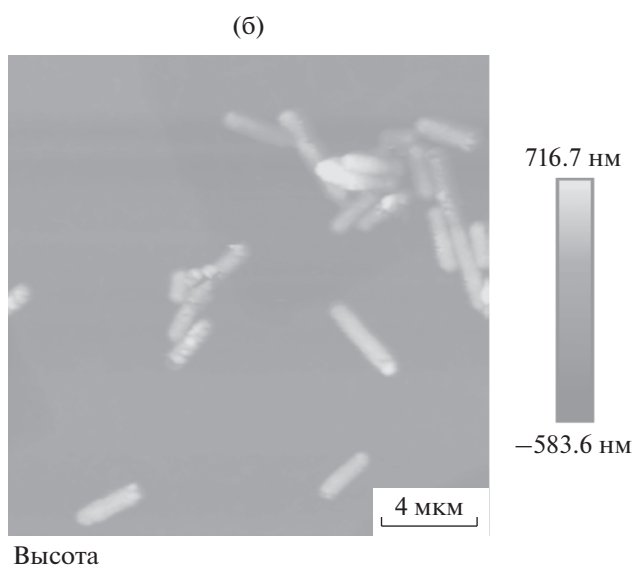
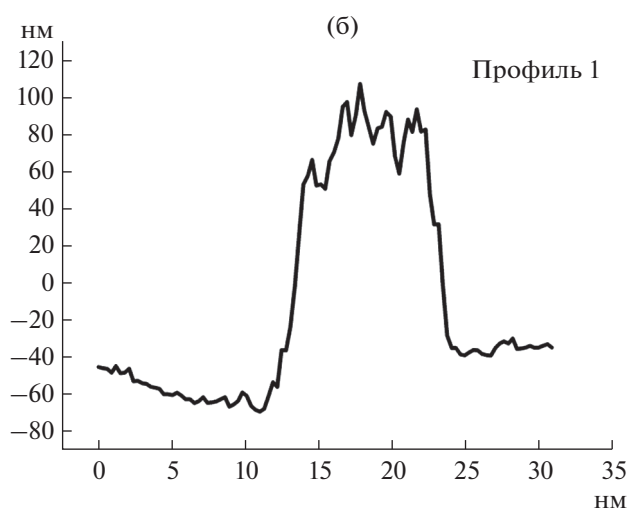
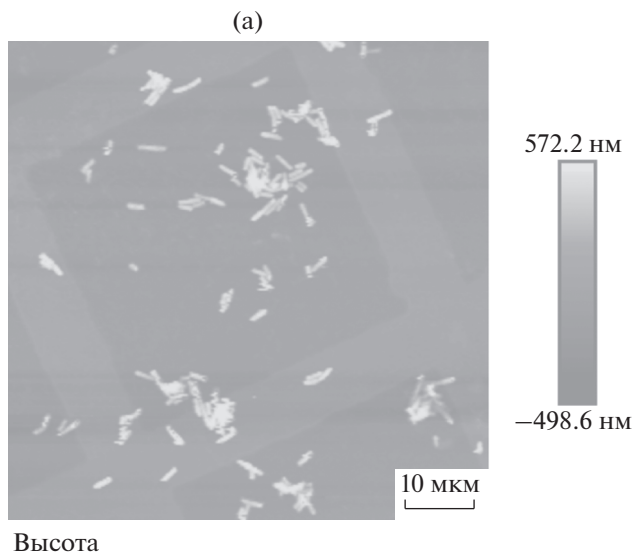
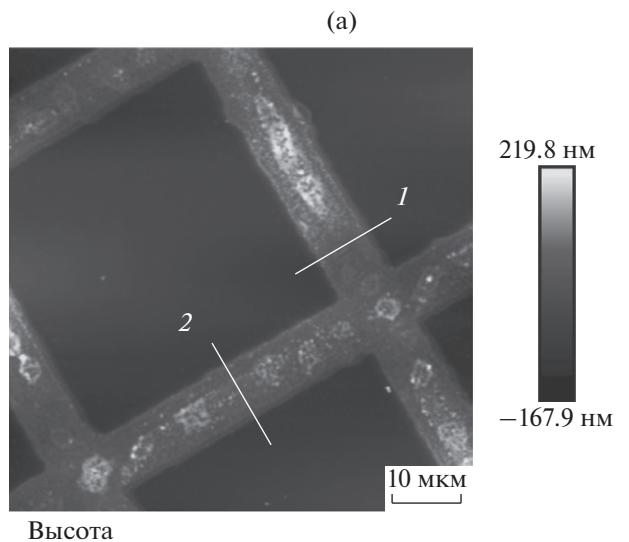


Рис. 1. АСМ-изображение (а) и профили стенок ячеек поверхностной решетки (б, в), измеренные по выделенным на фрагменте (а) направлениям.

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

(3–5 мкм) размеров. Как следует из рис. 2б, часть бактерий осаждается 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 предоставит возможность изолировать бактерии, локализованные на ребрах решетки, от поверхности самих ячеек и исключить их из общего анализа микроорганизмов.

На рис. 3а представлено РЭМ-изображение бактерий, нанесенных в небольшой концентрации

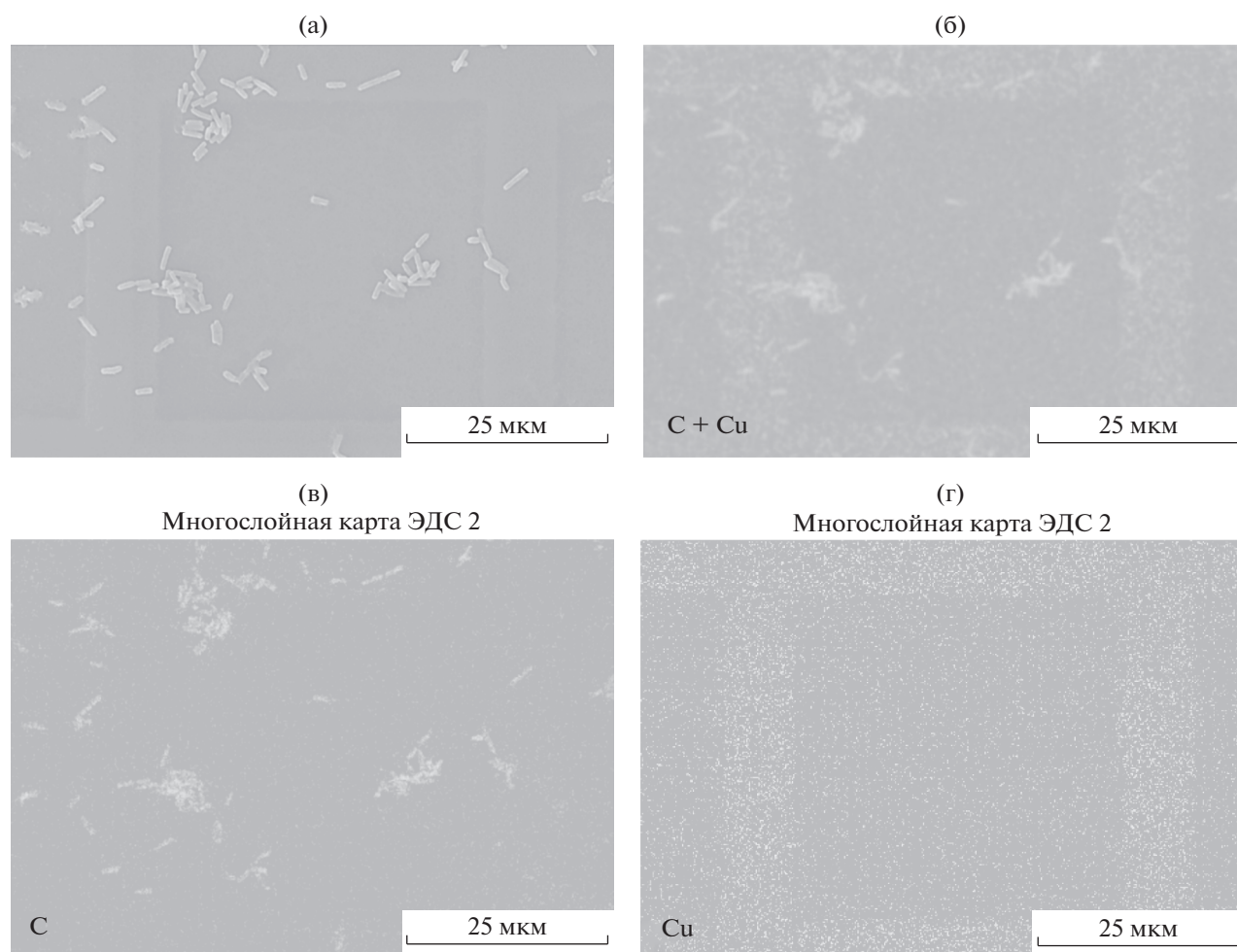


Рис. 3. РЭМ-изображение отдельной ячейки поверхностной решетки (а) с нанесенными на нее бактериями *Bacillus subtilis*, соответствующие ей ЭДС-карты для различных химических элементов: углерод + медь (б), углерод (в), медь (г).

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 – 10 мкм. Методом ЭДС (рис. 3б–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. Нанесенные бактерии располагаются на фоне решетки, определяемой конкретным химическим элементом. В частности, на рис. 3г 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 до-

статочно удобно регистрировать и анализировать распределение бактерий. При наложении ЭДС-карт меди и углерода (рис. 3б) становится возможным провести анализ распределения и плотности упаковки бактериальных клеток даже при отсутствии различимой визуальной профильной геометрической картины решеточной структуры подложки. На другом примере (рис. 3в) 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 относительно глубоко в объем образца.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в работе продемонстрирована возможность создания принципиально новых тех-

нологических контролирующих и анализирующих систем (микроструктурированных стеклянных подложек), а также заложена основа для разработки новых методик характеристики клеточного материала малого размера на основе АСМ-, РЭМ- и ЭДС-анализа. Использование наноструктурированных подложек с ячеистой структурой, сформированной методом ионной имплантации через маску, позволяет проводить подсчеты на сложных 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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Альперин П.М. *Камеры счетные. Большая медицинская энциклопедия*. Т. 12. 2-е изд. М.: БМЭ, 1959.
2. Stepanov A.L. *Ion Implantation Synthesis and Optics of Metal Nanoparticles*. Mauritius: LAMBERT Acad. Publ. 2018.
3. Azimi S., Breese M.B.H., Dang Z.Y., Yan Y., Ow Y.S., Bettiol A.A. // *J. Micromech. Microeng.* 2012. V. 22. P. 15015.
4. Stepanov A.L., Galyautdinov M.E., Evlyukhin A.B., Nuzhdin V.I., Valeev V.F., Osin Y.N., Kiyas R., Kavetskiy T.S., Chichkov B.N. // *Appl. Phys. A*. 2013. V. 111. P. 261.
5. Can-Uc B., Rangel-Rojo R., Marquez H., Rodriguez-Fernandez L., Oliver A. // *Jpt. Express*. 2015. V. 23. № 3. P. 3176.
6. Wang J., Mu X., Wang G., Liu C. // *Opt. Mater.* 2017. V. 73. P. 466.
7. Нуждин В.И., Валеев В.Ф., Галяутдинов М.Ф., Осин Ю.Н., Степанов А.Л. // *Квантовая электроника*. 2018. Т. 48. № 1. С. 82.
8. Степанов А.Л., Нуждин В.И., Галяутдинов М.Ф., Курбатова Н.В., Валеев В.Ф., Воробьев В.В., Осин Ю.Н. // *Письма 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. V. 22. P. 15015.
10. Atiqah N., Jaafar I.H., Ali M.Y., Asfana B. // *Adv. Mater. Res.* 2012. V. 576. P. 507.

Microstructured Substrates for Counting Bacteria, Formed by Ion Implantation Through a Mask

V. G. Evtuyugin, A. M. Rogov, L. R. Valeeva, V. V. Salnikov,
Yu. N. Osin, V. F. Valeev, V. I. Nuzhdin, A. L. Stepanov

The paper presents a new technological approach to the creation of nanostructured by ion implantation substrates for statistical analysis and visual characterization of small biological objects and microorganisms. The ion implantation with Ar⁺ through surface masks in the form of wire meshes of silicate glasses was used, periodic nanostructures with the form of meshes with cell sizes of 50 × 50 μm were formed. Testing of new types of substrates was carried out using the bacteria of the genus *Bacillus* with scanning electron microscopy, atomic force microscopy and energy dispersive analysis.

Keywords: nanostructured substrates, ion implantation, analytical microscopy, microorganisms.