

# ЛАНТАНОИДНОЕ КОНТРАСТИРОВАНИЕ КАК УСКОРЕННАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ПРОБОПОДГОТОВКИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

DOI: 10.17691/stm2017.9.3.03  
УДК 579.246:53.086:541.124/.127  
Поступила 11.05.2017 г.

© **И.В. Чеботарь**, д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологии<sup>1</sup>;  
ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологии и антибактериальной терапии<sup>2</sup>;  
**И.А. Новиков**, старший научный сотрудник лаборатории фундаментальных исследований,  
руководитель группы электронной микроскопии<sup>3</sup>;  
**А.М. Суббот**, к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории фундаментальных исследований,  
руководитель группы клеточных технологий<sup>3</sup>;  
**Н.А. Маянский**, д.м.н., зав. лабораторным отделом<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Национальный научно-практический центр здоровья детей, Москва, 119991, Ломоносовский пр., 2/1;

<sup>2</sup>НИИ неотложной детской хирургии и травматологии, Москва, 119180, ул. Большая Полянка, 22;

<sup>3</sup>Научно-исследовательский институт глазных болезней, Москва, 119021, ул. Россолимо, 11

**Цель исследования** — продемонстрировать достоинства лантаноидного контрастирования в качестве новой, сверхбыстрой технологии пробоподготовки микробиологических препаратов для сканирующей электронной микроскопии и обосновать возможность применения этой технологии в практической микробиологии.

**Материалы и методы.** Микробные клетки (бактерии *Acinetobacter baumannii*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* и грибы *Candida albicans*) и бактериальные биопленки на основе *Staphylococcus aureus* были контрастированы препаратом на основе хлорида неодима и визуализированы при помощи сканирующей электронной микроскопии. Наблюдения вели в режиме низкого вакуума, изображения захватывали в режиме детекции обратнорассеянных электронов с применением короткого рабочего отрезка 4,5–3,0 мм. В качестве препаратов сравнения использовали необработанные микроорганизмы либо микробные препараты, полученные при помощи традиционной пробоподготовки с обезвоживанием и напылением слоя золота-платины.

**Результаты.** Технология лантаноидного контрастирования позволила визуализировать и оценить диагностически значимые морфологические структуры микробных клеток *A. baumannii*, *C. diphtheriae*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *C. albicans*, включая их взаиморасположение, форму, размеры, наличие капсулы и жгутиков, внутриклеточные структуры (полифосфатные включения, перегородку), а также внеклеточный матрикс бактерий. Полученные изображения характеризовались высокой контрастностью. Это можно объяснить тем, что лантаноиды способны обеспечивать высокую плотность обратного рассеяния электронов под воздействием электронного пучка микроскопа, что приводит к высокой яркости на сканограммах локусов биологических объектов, насыщенных этими элементами.

**Заключение.** Лантаноидное контрастирование является перспективным методом пробоподготовки микроорганизмов для проведения сканирующей электронной микроскопии, что открывает возможности практического применения этого способа в диагностических технологиях клинической микробиологии.

**Ключевые слова:** микробные клетки; электронная микроскопия; сканирующая электронная микроскопия; пробоподготовка микробиологических препаратов; лантаноиды; микробиологическая диагностика.

**Как цитировать:** Chebotar I.V., Novikov I.A., Subbot A.M., Mayansky N.A. Lanthanoid staining as a fast technology of preparing microbiological specimens for scanning electron microscopy. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2017; 9(3): 23–30, <https://doi.org/10.17691/stm2017.9.3.03>

Для контактов: Чеботарь Игорь Викторович, e-mail: nizarnn@yandex.ru

## Lanthanoid Staining as a Fast Technology of Preparing Microbiological Specimens for Scanning Electron Microscopy

**I.V. Chebotar**, MD, DSc, Leading Researcher, Microbiology Laboratory<sup>1</sup>; Leading Researcher, Laboratory of Microbiology and Antibacterial Therapy<sup>2</sup>;

**I.A. Novikov**, Senior Researcher, Laboratory of Fundamental Research, Head of the Electron Microscopy Group<sup>3</sup>;

**A.M. Subbot**, MD, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Fundamental Research, Head of the Cellular Technologies Group<sup>3</sup>;

**N.A. Mayansky**, MD, DSc, Head of the Laboratory Unit<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Scientific and Practical Center of Children's Health, 2/1 Lomonosovsky Avenue, Moscow, 119991, Russian Federation;

<sup>2</sup>Clinical and Research Institute of Emergency Children's Surgery and Trauma, 22 Bol'shaya Polyanka St., Moscow, 119180, Russian Federation;

<sup>3</sup>Research Institute of Eye Diseases, 11 Rossolimo St., Moscow, 119021, Russian Federation

**The aim of the investigation** was to demonstrate advantages of lanthanoid staining as a novel super-fast technology of preparing microbiological specimens for scanning electron microscopy, and to ground the potentials of using this technology in practical microbiology.

**Materials and Methods.** Microbial cells (bacteria *Acinetobacter baumannii*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, and fungi *Candida albicans*), and *Staphylococcus aureus*-based bacterial biofilms were stained with the preparation based on neodymium chloride and visualized using scanning electron microscopy. Observations were carried out in the mode of low vacuum, images were captured in the mode of detecting back-scattered electrons using a short working section of 4.5–3.0 mm. Specimens were compared to the untreated microorganisms or microbial samples obtained by means of traditional specimen preparation with dehydration and sputtering a gold-platinum coating.

**Results.** The lanthanoid staining technology enabled visualization and evaluation of diagnostically relevant morphological structures of the following microbial cells: *A. baumannii*, *C. diphtheriae*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *C. albicans*, including their relative position, shape, dimensions, presence of capsules and flagella, intracellular structures (polyphosphate inclusions, septum) as well as an extracellular bacterial matrix. The obtained images were characterized by a high contrast, which may be explained by the fact that lanthanoids are capable of providing a high density of electron back-scattering under the impact of the microscope electron beam, resulting in a great brightness of the biological object loci saturated with these elements.

**Conclusion.** Lanthanoid staining of microorganisms is a perspective method of specimen preparation for scanning electron microscopy, which opens the possibility of practical application of this method in diagnostic technologies of clinical microbiology.

**Key words:** microbial cells; electron microscopy; scanning electron microscopy; microbiological specimen preparation; lanthanoids; microbiological diagnosis.

Визуализация микроорганизмов и их субклеточных структур имеет важное значение как для клинической микробиологии, так и для научно-исследовательской работы. В микробиологической практике используются различные варианты микроскопии. Одни из них являются рутинными и основаны на световой микроскопии примитивно окрашенных (например, обнаружение нейссерий при окраске метиленовым синим) или нативных (например, выявление трепонем методом темно-полевой микроскопии) препаратов. Другие применяются для решения фундаментальных научных задач на сложных исследовательских станциях и требуют сложной пробоподготовки материала. Электронная микроскопия до настоящего времени относилась ко второй категории методов. Главное

препятствие на пути ее внедрения в повседневную практику микробиологии — трудоемкая, длительная и дорогостоящая подготовка биологических проб. Даже самые современные варианты пробоподготовки, включающие фиксацию, обезвоживание, приготовление ультратонких срезов (для трансмиссионной электронной микроскопии) или металлизацию (для сканирующей электронной микроскопии — СЭМ), занимают не менее суток. Такие сроки и трудоемкость делают данный метод сложным для использования в рутинной практике клинической микробиологии.

Еще 5 лет назад мы были уверены в бесперспективности применения СЭМ для решения задач клинической микробиологии [1]. Сейчас известны многочисленные попытки модифицировать пробоподготовку

для электронной микроскопии с целью ее упрощения. В частности, J.H. Priester с соавт. сократили срок пробоподготовки препаратов микробных биопленок для СЭМ до 5 ч 30 мин за счет оригинальной методики окраски и фиксации [2]. Однако и такой срок остается слишком большим, а фиксация подразумевает использование токсичных субстанций (тетраоксид осмия, глутаровый альдегид). Другой вариант ускорения пробоподготовки для СЭМ был реализован путем обработки поверхности образца концентрированными кислотами — соляной (HCl) или плавиковой (HF) [3]. Такая обработка, по мнению авторов, должна была полноценно заменить металлизацию поверхности изучаемого материала. Результаты апробации этого способа оказались неоднозначными из-за корродирующего действия кислот на образец и детали электронного микроскопа. Так или иначе, перечисленные методы не смогли обеспечить внедрения СЭМ в повседневную микробиологическую практику. Между тем существуют данные об успешном использовании лантаноидов (хлорида неодима) в экспресс-подготовке некоторых типов биологических образцов для различных типов электронной микроскопии [4, 5].

**Цель исследования** — продемонстрировать достоинства лантаноидного контрастирования в качестве новой, сверхбыстрой технологии пробоподготовки микробиологических препаратов для сканирующей электронной микроскопии и обосновать возможности применения этой технологии в практической микробиологии.

**Материалы и методы.** В работе использовались референс-штаммы микроорганизмов, полученные из Американской коллекции типовых культур — American Type Culture Collection (*Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619), и коллекционные штаммы (*Candida albicans* 66-1556, *Corynebacterium diphtheriae*, биовар mitis, нетоксигенный штамм 11-611, *Klebsiella pneumoniae* 36-2246) лаборатории микробиологии Национального научно-практического центра здоровья детей Минздрава России.

Микробные препараты для СЭМ готовили из колоний, выросших на плотной питательной среде, и из биопленок, сформированных в питательном бульоне. Для получения бактерий колониального происхождения использовали кровяной агар с добавлением 3% лошадиной сыворотки. Грибы *C. albicans* культивировали на агаре Сабуро (Becton, Dickinson and Company, США). Культивирование всех микроорганизмов, кроме *S. pneumoniae*, проводили при 37°C в воздушной атмосфере. *S. pneumoniae* культивировали при 37°C в присутствии 5% CO<sub>2</sub>. Клетки из колоний суточных культур суспендировали в растворе Хенкса без фенолового красного в концентрации, соответствующей 1,0 ед. оптической плотности по шкале МакФарланда. По 0,1 мл суспензии наносили на диски из полистирола (диаметр 7 мм), инкубировали 15 мин во влажной

камере при 37°C для обеспечения адгезии клеток на поверхности. Сразу же после этого с помощью микропипетки с поверхности дисков удаляли остатки микробной суспензии, а поверхность с адгезированными микробными клетками обрабатывали реактивами из набора для контрастирования BioREE в соответствии с протоколом фирмы-изготовителя (ООО «Глаукон», Россия). Фиксации и обезвоживанию образцы не подвергались.

В качестве препаратов сравнения использовали нативные (неконтрастированные) микроорганизмы, адгезированные на поверхности дисков из полистирола. Для объективизации результатов сравнения изображений контрастированных хлоридом неодима стафилококков и нативных стафилококков были построены гистограммы распределения яркости точек на сканограммах, полученных при идентичных параметрах съемки, и вычислена разница между двумя модами распределения яркости.

В другой серии экспериментов сравнивали СЭМ-изображения контрастированных лантаноидами биопленок и биопленок после общепринятой пробоподготовки для СЭМ. Биопленки формировали на поверхности дисков (диаметр 7 мм) из полистирола, помещенных в лунки 24-луночного планшета (Greiner Bio-One GmbH, Австрия). Для этого использовали известный биопленкообразующий штамм стафилококка *S. aureus* ATCC 29213. Его суточную культуру (объем — 0,05 мл) в бульоне Мюллера–Хинтона, стандартизованную по оптической мутности до показателя 0,5 ед. по шкале МакФарланда, инокулировали в лунки планшета с 0,95 мл трипсинизированного соевого бульона TSB (tryptic soy broth) (Becton, Dickinson and Company, США), содержащего 1% глюкозы. Инкубировали 48 ч при 37°C. Диск с биопленкой извлекали из планшета и дважды ополаскивали изотоническим раствором хлорида натрия. Сразу же после этого поверхность с биопленкой обрабатывали реактивами из набора для контрастирования BioREE (как было описано выше). Фиксации и обезвоживанию образцы не подвергались. В качестве препарата сравнения использовали биопленки, прошедшие общепринятую пробоподготовку для СЭМ, процедуры фиксации 2,5% глутаровым альдегидом, постфиксации тетраоксидом осмия с последующим обезвоживанием (батарея спиртов от 20 до 97%, высушивание в обход критической точки) и напылением слоя золота-платины [6].

Образцы неокрашенных препаратов и препаратов после лантаноидного контрастирования закрепляли на предметном столике микроскопа посредством адгезивной углеродной ленты (Nisshin EM, Co., Япония) и размещали в камере сканирующего электронного микроскопа (EVO LS10, Carl Zeiss, Германия). Наблюдения вели в режиме низкого вакуума при ускоряющем напряжении 21–27 кВ и токе на образце 360–520 пА. Использовали катод LaB<sub>6</sub>. Изображения захватывали в режиме детекции обратнорассеянных электронов (BSE). Размер кадра составлял 3072×2304

пикселей. Для получения удовлетворительного разрешения микроскопа в режиме обратнорассеянных электронов наблюдения проводили с применением короткого рабочего отрезка 4,5–3,0 мм.

Образцы, подготовленные по классической схеме с напыленной пленкой золота-платины, закрепляли на предметном столике микроскопа при помощи углеродной ленты (Nisshin EM, Co., Япония). Посредством проводящей пасты обеспечивали отведение заряда с напыленной поверхности образца. Наблюдения проводили в режиме высокого вакуума при ускоряющем напряжении 20 кВ и токе на образце 260 пА. Использовали катод LaB<sub>6</sub>. Изображения микрофотографии образца получали в режиме детекции вторичных электронов.

### Результаты

На первом этапе работы было проведено сравнение полученных СЭМ-изображений препаратов нативных (неокрашенных) микробных клеток и аналогичных клеток, прошедших обработку лантаноидами (хлоридом неодима). Эти изображения позволяют визуаль-но представить различия между нативными клетками *S. aureus* ATCC 29213 и аналогичными стафилокок-

ками после контрастирования. Отчетливо видно, что лантаноидное окрашивание (рис. 1, а) обеспечивает получение высококонтрастных изображений, тогда как препараты неокрашенных стафилококков (рис. 1, в) отличаются низкой контрастностью.

При использовании детектора обратнорассеянных электронов контрастность формируемого изображения определяется средней атомной массой в каждой точке визуализируемого образца. Насыщение образца элементами группы лантана привело к значительному увеличению контрастности изображения. Объективно такие различия (в контрастности) можно проиллюстрировать (продемонстрировать описанием) гистограммами распределения яркости точек сравниваемых изображений. В обоих случаях на сканограммах яркость точек имеет выраженный бимодальный характер (рис. 1, б, г). Первая мода (совокупность более темных точек) характеризует интенсивность обратного рассеяния электронов в приповерхностном слое полистирола, а вторая — в структурах микроорганизмов. При соблюдении одинаковых условий получения изображений яркость полистирола составила 64–66 усл. ед. цифровой яркости, для неокрашенных микро-

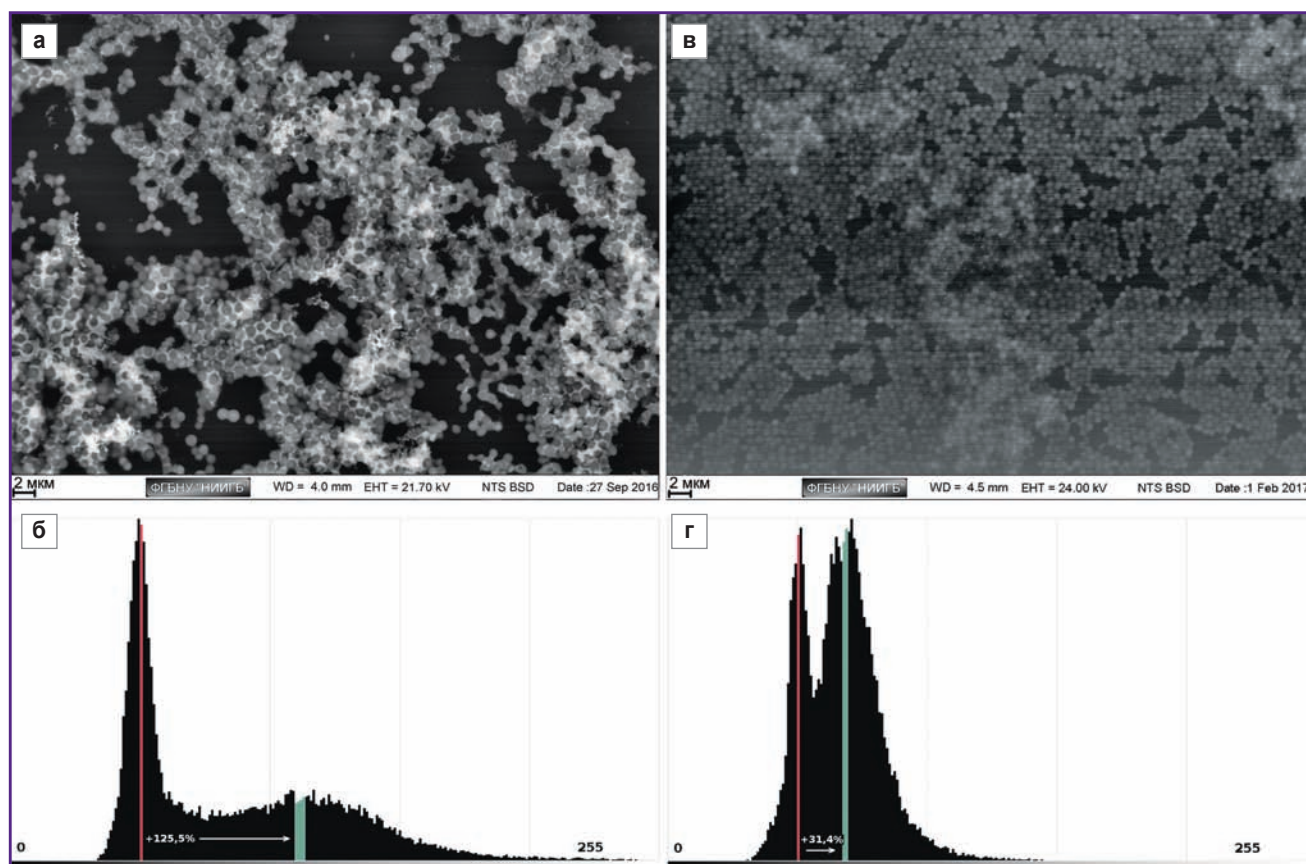
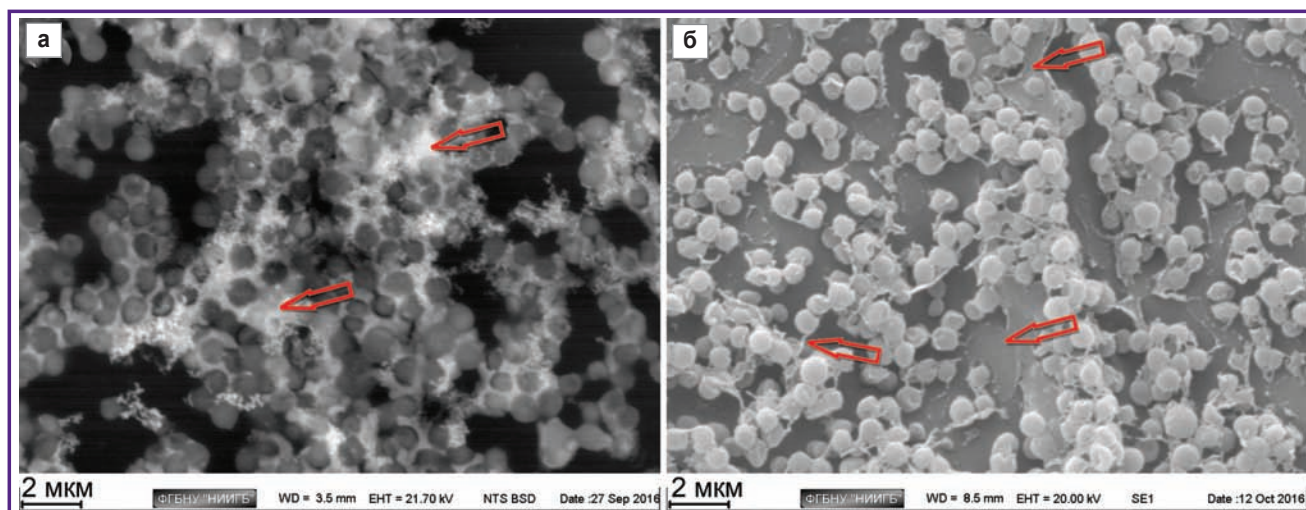


Рис. 1. Клетки *S. aureus* ATCC 29213:

СЭМ-изображения (а) и гистограммы распределения яркости точек на изображении (б) препаратов, контрастированных хлоридом неодима; СЭМ-изображения (в) и гистограммы распределения яркости точек на изображении (г) нативных (неокрашенных) препаратов



**Рис. 2. СЭМ-изображения биопленок *S. aureus* ATCC 29213:**

а — контрастирование хлоридом неодима; б — общепринятая пробоподготовка для СЭМ, включающая обезвоживание образца и металлизацию его поверхности; стрелки указывают на внеклеточный матрикс биопленки; режим проведения микроскопии см. в разделе «Материалы и методы»

организмов яркость составила 85 усл. ед., а для контрастированных лантаноидами — 146 усл. ед. В процентном выражении контрастность обработанных хлоридом неодима микроорганизмов относительно полистироловой подложки выросла с 31,4 до 125,5%. Важным недостатком изображения, полученного при СЭМ неокрашенных стафилококков, является отсутствие визуализации внеклеточных структур — слизи, биопленочного матрикса.

*Второй этап работы* позволил оценить качество СЭМ-изображений биопленок после лантаноидного окрашивания и общепринятой пробоподготовки, включающей обезвоживание образца и металлизацию его поверхности (рис. 2). Лантаноидное контрастирование биопленок *S. aureus* ATCC 29213 (рис. 2, а) позволило выявить два главных структурных элемента биопленки — клетки и внеклеточный (биопленочный) матрикс. Клетки после окрашивания хлоридом неодима демонстрируют характерные для стафилококков размеры, морфологию и типичную архитектуру кластеров. Изображения стафилококков отличаются хорошей контрастностью, высокой четкостью границ клеток. Внеклеточный (биопленочный) матрикс представлен аморфной субстанцией, которая участвует в объединении стафилококков в многоклеточные конгломераты. Важная особенность изображений — в том, что они дают представление о трехмерном взаиморасположении клеток и матрикса.

Метод традиционной пробоподготовки позволил получить изображения стафилококковых биопленок с аналогичными характеристиками клеточных элементов, но с иной сохранностью матрикса. Матрикс при традиционной пробоподготовке не обладает целостностью, имеет участки с разрывами и отличается неплотной интеграцией с клеточными кластерами.

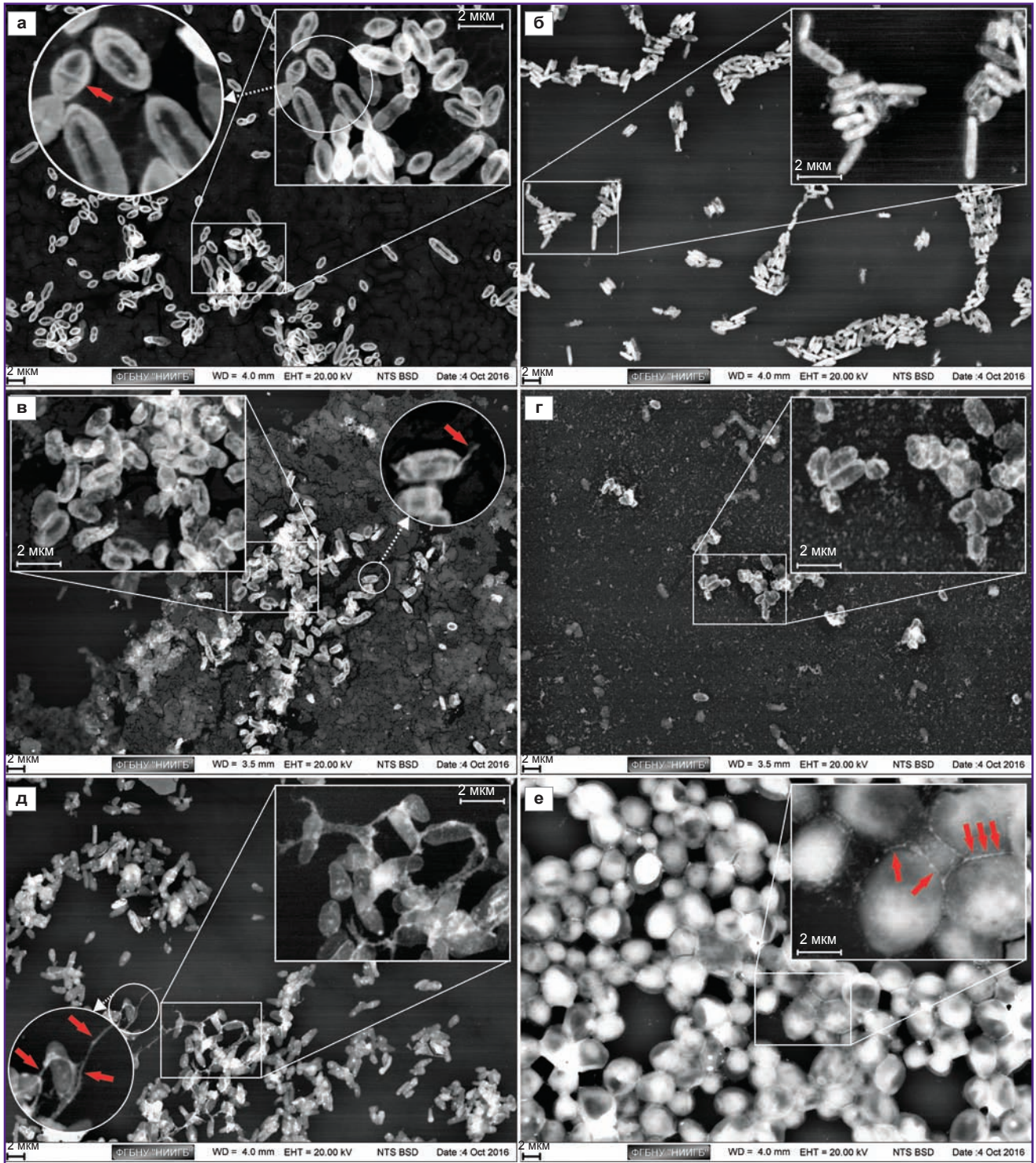
*На третьем этапе* исследованы возможности лантаноидного окрашивания некоторых клинически значимых микроорганизмов из разных таксономических групп. Как уже было сказано, стафилококки *S. aureus* ATCC 29213, представители грампозитивных бактерий, хорошо контрастируются лантаноидами (см. рис. 1, а), на изображении имеют типичную шаровидную форму (диаметр — от 0,7 до 1 мкм), плотно организованы в многоклеточные кластеры. Они не обладают капсулой, но связаны с хорошо контрастируемым межклеточным веществом аморфной структуры.

Грамположительные бактерии, пневмококки *S. pneumoniae* ATCC 49619 (рис. 3, а), характеризуются типичной ланцетовидной формой и расположены в виде диплококков, высококонтрастны. Некоторые из клеток имеют внутриклеточные перегородки. У большинства из клеток встречаются контрастные капсуловидные образования.

Представители грамотрицательных бактерий энтеробактерии *K. pneumoniae* 36-2246 (рис. 3, б) демонстрируют типичную хорошо контрастированную палочковидную форму и размеры (около 2 мкм в длину), неправильное взаиморасположение друг относительно друга. Некоторые клетки имеют неконтрастные относительно тонкие капсуловидные образования.

Другие грамотрицательные бактерии, не ферментирующие глюкозу — *P. aeruginosa* ATCC 27853 (рис. 3, в) и *A. baumannii* ATCC 19606 (рис. 3, г), также визуализируются в своих типовых морфологических формах с неправильным взаиморасположением клеток друг относительно друга. Их контуры высококонтрастны, некоторые клетки *P. aeruginosa* несут полярный жгутик. Наличие капсул у *P. aeruginosa* и *A. baumannii* не прослеживается.

Представители класса *Actinobacteria* коринебакте-



**Рис. 3.** Изображения представителей разных таксономических групп микроорганизмов, полученные при помощи СЭМ-препаратов, контрастированных хлоридом неодима:

*а* — *S. pneumoniae*, стрелка указывает на внутриклеточную перегородку; *б* — *K. pneumoniae*; *в* — *P. aeruginosa*, стрелка указывает на полярно расположенный жгутик; *г* — *A. baumannii*; *д* — *C. diphtheriae*, биовар *mitis*, стрелки указывают на нитевидные структуры, адгезирующие на себе коринебактерии (корд-фактор); *е* — *C. albicans*, стрелки указывают на ярко контрастированные межклеточные контакты; режим проведения микроскопии см. в разделе «Материалы и методы»

рии *C. diphtheriae* и биовар *mitis* расположены в виде неправильных скоплений, имеют четкие контуры, палочковидную форму, длина — около 2 мкм (рис. 3, д). В цитоплазме более 80% клеток обнаруживаются ярко окрашенные включения диаметром от 0,1 до 0,4 мкм. В некоторых кластерах коринебактерии скреплены между собой тонкими (диаметр 0,1 мкм и менее) нитевидными структурами.

Морфология грибов *C. albicans* 66-1556 (рис. 3, е) соответствует дрожжевой форме существования этого гриба. Клетки, скрепленные в кластеры, имеют округлую форму и высококонтрастные границы (размеры — от 3 до 6 мкм в диаметре). Более чем у 50% клеток регистрируется ярко контрастированная область в центре клеток, ее диаметр составляет более 40% от диаметра клетки. Также ярко окрашены области межклеточных контактов толщиной менее 0,1 мкм.

**Обсуждение.** Полученные результаты показали, что, несмотря на разный характер изображений, визуализация микроорганизмов на СЭМ в случае применения техники лантаноидного контрастирования не уступает традиционной пробоподготовке с напылением металлов, а получаемые изображения значительно превосходят по контрастности изображения препаратов без пробоподготовки. Высокая контрастность изображений имеет под собой физические и структурно-биохимические основы. Известно, что лантаноиды, являясь элементами с высоким атомным номером, способны обеспечивать высокую плотность обратного рассеяния электронов под воздействием электронного пучка микроскопа, что и приводит к высокой яркости на сканограммах локусов биологических объектов, насыщенных этими элементами [4, 7]. Известно несколько механизмов захвата и депонирования лантаноидов в биологических системах, один из них определяется способностью замещать кальций в цепочках обмена, а второй — способностью активно связываться с фосфатными остатками. Кроме фосфолипидсодержащих мембран лантаноиды могут контрастировать и другие биологические структуры — богатые фосфором и кальцием фосфорсодержащие биополимеры, например ДНК, полифосфаты (волютин), а также кальцийзависимые группы белков [8–10]. Эти свойства позволяют использовать лантаноиды для визуализации живых объектов. Полученные в настоящей работе результаты применения техники лантаноидного контрастирования к микробиологическим образцам являются экспериментальным подтверждением перечисленных гипотетических предпосылок.

Изображения показали, что окрашенные лантаноидами микроорганизмы демонстрируют характерные для своих таксонов морфологические признаки. В частности, мембраны оболочки микробов (цитоплазматическая мембрана, наружная мембрана грамотрицательных бактерий) строго повторяют форму клеток и отражают их реальные размеры. Области хромосом, находящиеся в центре клеток, также контрастируют-

ся лантаноидами из-за наличия большого количества фосфатных групп ДНК. Полифосфат волютин, присутствующий в составе коринебактерий, также отчетливо визуализируется. В образцах, обработанных хлоридом неодима, наблюдается высокая структурная сохранность внеклеточного матрикса, который содержит дериваты ДНК, мембран, протеинов, и обнаруживаются наличие межмикробных контактов и взаиморасположение клеток друг относительно друга [11]. Интересным является факт визуализации внутриклеточных перегородок, что продемонстрировано на модели пневмококков (см. рис. 3, а). Обнаруженные перегородки являются признаком начала клеточного деления, ранее они выявлялись у бактерий лишь методом трансмиссионной электронной микроскопии на ультратонких срезах [12]. Таким образом, применение техники лантаноидного контрастирования в сочетании с использованием детектора обратнорассеянных электронов дает возможность визуализировать не только внешние структуры, но и «заглянуть» внутрь клетки, что недоступно для СЭМ с традиционной пробоподготовкой.

Лантаноидное окрашивание позволило получить оригинальные изображения бактериальных биопленок. Напомним, что биопленки представляют собой комплекс клеток и внеклеточного матрикса [13]. Именно обнаружение внеклеточного матрикса позволяет поставить диагноз биопленочного процесса [1]. В связи с этим лантаноидное контрастирование, которое надежно распознает внеклеточные структуры матрикса (см. рис. 2, а), может играть важную роль в качестве инструмента для диагностики инфекций, ассоциированных с биопленками.

Нельзя не отметить высокую скорость выполнения метода — процесс обработки микробов препаратом на основе хлорида неодима занимает 30 мин. Такая скорость является еще одним фактором, обеспечивающим продвижение метода в область практической диагностики.

**Заключение.** Предлагаемый метод пробоподготовки препаратов для сканирующей электронной микроскопии, основанный на контрастировании микробных клеток лантаноидами, позволяет визуализировать и оценить основные морфологические структуры микробных клеток, включая форму, размеры, взаиморасположение, их капсулу и жгутики, некоторые внутриклеточные структуры (полифосфатные включения, перегородку во время деления), а также внеклеточный матрикс. Метод является быстро реализуемым, что открывает возможности его практического применения в диагностических технологиях клинической микробиологии.

**Финансирование исследования.** Микробиологическая часть исследования проводилась при финансовой поддержке РФФИ (грант 16-04-01528), электронно-микроскопические исследования финансировались ФАНО России в рамках НИР 0511-2014-0031.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Литература/References

1. Чеботарь И.В., Гурьев Е.Л. Лабораторная диагностика клинически значимых биопленочных процессов. Вопросы диагностики в педиатрии 2012; 4(4): 15–20. Chebotar I.V., Guryev E.L. Laboratory diagnostics of clinically significant microbial biofilms. *Voprosy diagnostiki v pediatrii* 2012; 4(4): 15–20.
2. Priester J.H., Horst A.M., Van De Werfhorst L.C., Saleta J.L., Mertes L.A.K., Holden P.A. Enhanced visualization of microbial biofilms by staining and environmental scanning electron microscopy. *J Microbiol Methods* 2007; 68(3): 577–558, <https://doi.org/10.1016/j.jmimet.2006.10.018>.
3. Ensikat H.-J., Weigend M. Creating internal conductivity in dry biological SEM samples by a simple vapour treatment. *J Microsc* 2014; 256(3): 226–230, <https://doi.org/10.1111/jmi.12177>.
4. Новиков И.А., Суббот А.М., Федоров А.М., Грибоедова И.Г., Антонов Е.Н., Вахрушев И.В. Суправитальное контрастирование лантаноидами для визуализации структуры биологических образцов на сканирующем электронном микроскопе. Гены и клетки 2015; 10(2): 90–96. Novikov I.A., Subbot A.M., Fedorov A.M., Griboedova I.G., Antonov E.N., Vakhrushev I.V. Supravital lanthanoid staining for scanning electron microscopy of biological objects. *Geny i kletki* 2015; 10(2): 90–96.
5. Nakakoshi M., Nishioka H., Katayama E. New versatile staining reagents for biological transmission electron microscopy that substitute for uranyl acetate. *J Electron Microsc (Tokyo)* 2011; 60(6): 401–407, <https://doi.org/10.1093/jmicro/df084>.
6. Pogorelov A.G., Chebotar I.V., Pogorelova V.N. Scanning electron microscopy of biofilms adherent to the inner catheter surface. *Bull Exp Biol Med* 2014; 157(5): 711–714, <https://doi.org/10.1007/s10517-014-2648-0>.
7. Novikov I.A., Subbot A.M., Kiryushchenkova N.P., Nesterova T.V., Gabashvili A.N., Sitnikov A.V., Bursov A.I. Fast and easy method of lanthanoid staining for visualization of cellular ultrastructure and spatial arrangement. *AIP Conference Proceedings* 2016; 1748(1): 020009, <https://doi.org/10.1063/1.4954343>.
8. Doggenweiler C.F., Frenk S. Staining properties of lanthanum on cell membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1965; 53(2): 425–430, <https://doi.org/10.1073/pnas.53.2.425>.
9. Shaklai M., Tavassoli M. Lanthanum as an electron microscopic stain. *J Histochem Cytochem* 1982; 30(12): 1325–1330, <https://doi.org/10.1177/30.12.6185564>.
10. Evans C.H. *Biochemistry of the lanthanides*. New York: Springer Science & Business Media; 2013; 453 p.
11. Чеботарь И.В., Маянский А.Н., Маянский Н.А. Матрикс микробных биопленок. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия 2016; 18(1): 9–19. Chebotar I.V., Mayansky A.N., Mayansky N.A. Matrix of microbial biofilms. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya* 2016; 18(1): 9–19.
12. Рыбальченко О.В., Бондаренко В.М., Добрица В.П. Атлас ультраструктуры микробиоты кишечника человека. СПб: ИИЦ ВМА; 2008; 112 с. Rybal'chenko O.V., Bondarenko V.M., Dobritsa V.P. *Atlas ul'trastruktury mikrobioty kishhechnika cheloveka* [Atlas of the ultrastructure of human gut microbiota]. Saint Petersburg: IITs VMA; 2008; 112 p.
13. Donlan R.M., Costerton J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15(2): 167–193, <https://doi.org/10.1128/cmr.15.2.167-193.2002>.