



УДК 579.234:579.842.23

Исследование морфологических особенностей клеток бактерий *Yersinia pestis*, выращенных при различных температурных условиях, методом атомно-силовой микроскопии



Д. В. Уткин, Е. Г. Булгакова, П. С. Ерохин, О. С. Кузнецов, В. Е. Куклев, Н. А. Осина

Уткин Денис Валерьевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории диагностических технологий, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, rusrapi@microbe.ru

Булгакова Елена Германовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, rusrapi@microbe.ru

Ерохин Павел Сергеевич, кандидат физико-математических наук, младший научный сотрудник лаборатории диагностических технологий, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, rusrapi@microbe.ru

Кузнецов Олег Святославович, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории диагностических технологий, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, rusrapi@microbe.ru

Куклев Василий Евгеньевич, кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией диагностических технологий, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, rusrapi@microbe.ru

Осина Наталия Александровна, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной диагностики, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, rusrapi@microbe.ru

Атомно-силовая микроскопия при изучении клеток бактерий позволяет определить такие морфологические параметры, как длина, ширина, толщина клетки, ее периметр, площадь сечения, объем, среднеквадратичную шероховатость поверхности клетки, которая зависит от степени укладки пептидогликана и плотности липополисахарида. Целью данной работы было изучение изменений морфологических параметров клетки и клеточной поверхности бактерий при изменении температурных условий среды культивирования на модели *Y. pestis*. Наряду с традиционными морфологическими параметрами были определены коэффициенты, характеризующие функциональное состояние клеток – пластичность, ригидность клеточной стенки. Измерения осуществляли с использованием стандартных методов полуконтактной атомно-силовой микроскопии и программы анализа АСМ-изображений. На примере возбудителя чумы *Y. pestis* показано, что повышение температуры культивирования бактерий с 28 до 37 °С приводит к увеличению объема клетки, шероховатости поверхности клетки, ригидности клеточной стенки. Понижение температуры культивирования *in vitro* с 28 до 4 °С приводит к

потере ригидности клеточной стенки, сглаживанию поверхности и увеличению пластичности. Полученные результаты расширяют сведения о механизмах адаптации чумного микроба в различных температурных условиях.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, бактериальная клетка, атомно-силовая микроскопия, морфометрический анализ, поверхностная структура, температура культивирования.

DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2019-19-1-87-93>

Введение

В настоящее время для изучения микробиологических объектов наряду со световой, электронной и люминесцентной микроскопией используются сканирующая зондовая микроскопия и ее вариант – атомно-силовая микроскопия (АСМ). Атомно-силовая микроскопия прошла путь от простой визуализации микроорганизмов к изучению живой природы, структуры и роли отдельных клеточных элементов. Имеются достоверные литературные данные о применении АСМ для изучения морфологии клеток бактерий, субклеточных структур, вирусов, способности микроорганизмов к споро- и капсулообразованию; исследования архитектоники биопленок; для выявления специфических эпитопов; определения чувствительности к бактериофагам, антибактериальным препаратам, факторам биотической и абиотической природы; оценки морфофункционального состояния клетки [1–8]. Морфология, поверхностная и внутренняя ультраструктура клеток бактерий достаточно хорошо изучены методами световой и электронной микроскопии. В то же время морфологические исследования микроорганизмов микроскопическими методами позволяют определить только двумерные характеристики: длину (L); ширину (W); периметр (P); площадь сечения клетки (S); коэффициент вытянутости клетки (L/W), характеризующий ее форму. Атомно-силовая микроскопия в силу своих физических возможностей позволяет определить трехмерные параметры: толщину (высоту) клетки (H); среднеквадратичную шероховатость поверхности клетки, которая характеризует степень укладки пептидогликана клеточной стенки;



объем клетки (V); коэффициент уплощенности (S/H), характеризующий степень пластичности клетки; индекс (L) отношения ширины клетки к ее высоте (W/H), характеризующий степень ригидности клеточной стенки (у нативных клеток $L=1$, у клеток со сниженной ригидностью индекс L повышается) [9–11]. Указанные параметры являются индикаторами морфофункционального состояния клетки и играют важную роль в формировании ее статуса в разных условиях и при действии различных факторов.

Одним из наиболее значимых факторов окружающей среды, влияющих на структурно-функциональные особенности бактерий, в том числе возбудителя чумы *Yersinia pestis*, обитающего в различных условиях, является температурный. Следует отметить, что при изучении влияния температуры культивирования на клетки бактерий в основном учитываются линейные размеры клеток и среднеквадратичная шероховатость поверхности клетки [12–15]. В настоящей работе проведена оценка влияния температуры на расширенный спектр морфометрических параметров.

Целью данной работы было изучение изменений морфологических параметров клетки и клеточной поверхности бактерий при изменении температурных условий среды культивирования на модели *Y. pestis*.

Материалы и методы

В работе использовали штаммы чумного микроба Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб» (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб») *Y. pestis* EV НИИЭГ (вакцинный) и природный штамм *Y. pestis* ssp. *altaica* 1559, выделенный из блох на территории Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы (Республика Алтай) в 2012 г.

Бактерии выращивали на агаре Хоттингера (рН 7,2) при трех температурных режимах: 28 °С, 37 °С и 4 °С. Подготовку штаммов проводили в соответствии с МУ 1.3.3103-13 «Организация работы лабораторий, использующих методы электронной и атомно-силовой микроскопии при исследовании культур микроорганизмов I–IV групп патогенности». Клетки в стационарной фазе роста смывали с агара в 1 мл 2,5% глутаральдегидного фиксатора, приготовленного по D. Sabatini et al. [16] и инкубировали в течение 2 ч при температуре 4 °С. Обеззараженные взвеси бактерий объемом 1 мл переносили в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл (Ахуген, США) и центрифугировали при 6000 об/мин в течение 20 мин для осаждения клеток. Супернатант отбирали в емкость для сброса отходов. Осадок

суспендировали в 1 мл дистиллированной воды и повторно центрифугировали при 6000 об/мин в течение 20 мин. Супернатант отбирали, а осадок суспендировали в 1 мл дистиллированной воды. Взвесь микроорганизмов объемом 4 мкл наносили на покровное стекло и высушивали путем естественного высыхания на воздухе.

Исследования проводили на сканирующем зондовом микроскопе Solver P47-PRO (НТ-МДТ, Россия) в прерывисто-контактном режиме. Сканирование образцов осуществляли с применением кремниевых зондов серии NSG01 (НТ-МДТ, Россия) с жесткостью 5,1 Н/м, резонансной частотой 150 кГц, радиусом закругления иглы 10 нм. Обработку полученных АСМ-изображений, измерения геометрических параметров выполняли с использованием программного обеспечения Image Analysis (НТ-МДТ, Россия). Статистически рассчитывали достоверность различий между параметрами с уровнем значимости 0,95 с определением критерия Стьюдента (t), коэффициент вариации, коэффициент корреляции Спирмена (rs).

Результаты и их обсуждение

Проведена сравнительная оценка морфологических изменений коллекционного (вакцинного) и природного (вирулентного) штаммов *Y. pestis*, выращенных в разных температурных условиях: при температуре 28 °С (стандартная температура культивирования возбудителя и температура тела переносчика – блохи), при температуре 37 °С (температура, свойственная теплокровным хозяевам), при температуре 4 °С (гипотермическая температура, наблюдающаяся в норах и у инфицированных мелких млекопитающих в период зимней спячки [17]) (рис. 1–3).

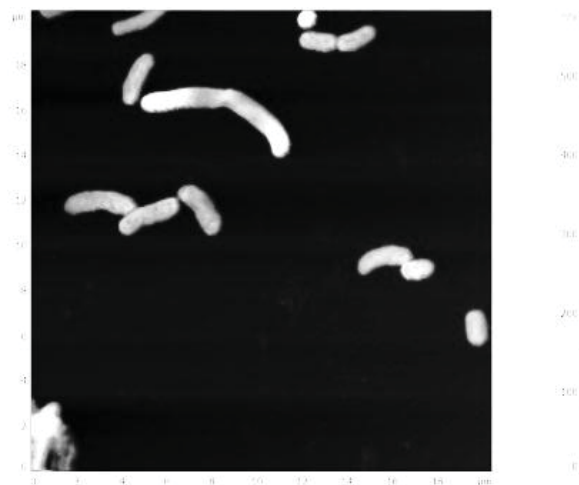


Рис. 1. АСМ штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенного при температуре культивирования 28 °С

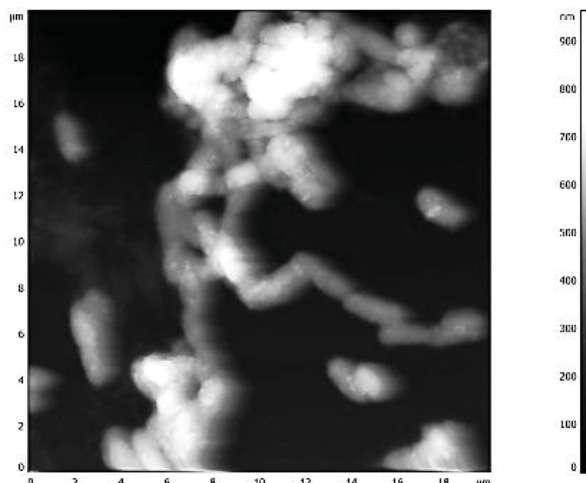


Рис. 2. АСМ штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенного при температуре культивирования 37 °С

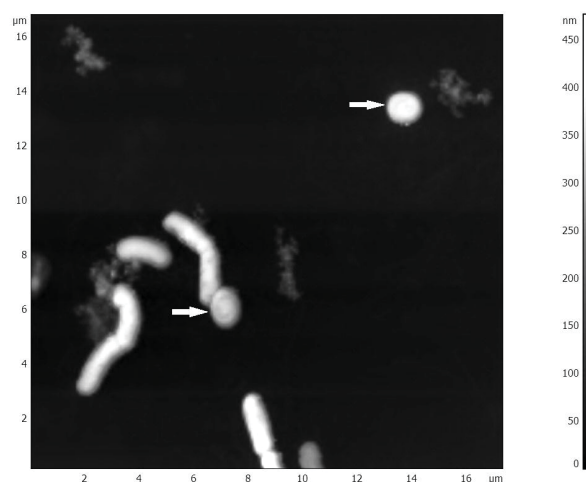


Рис. 3. АСМ штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенного при температуре культивирования 4 °С, стрелкой указаны округлые клетки

По результатам морфометрического анализа установлено, что коллекционный штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенный при стандартной температуре культивирования 28 °С, характеризуется наличием однородных по морфологии клеток бактерий с коэффициентом вариации линейных размеров клеток менее 10%. Длительное хранение и многочисленные пассажи в условиях *in vitro* на питательных средах привели к формированию гомогенной популяции и стабильных форм клеток.

При изменении температуры культивирования с 28 до 37 °С объем клеток у данного штамма увеличивался в среднем в 1,7 раза за счет увеличения ширины (рис. 4). Изменения были статистически значимыми ($t = 2,30$). Среднеквадратичная шероховатость поверхности клетки увеличивалась с (25 ± 5) до (30 ± 5) нм, что, по-

видимому, связано с синтезом на поверхности клетки капсульного антигена F1 при температуре 37 °С [18], а также с увеличением плотности липополисахарида клеточной стенки [15]. Статистически значимых изменений в пластичности клетки и ригидности клеточной стенки не обнаружено, критерий Стьюдента составил $t = 0,35$ в обоих случаях (см. рис. 4).

При понижении температуры культивирования до гипотермического значения (4 °С) объем клетки уменьшался в 2,1 раза, что согласуется с литературными данными [17]. Наблюдалось формирование округлых клеток (см. рис. 3), свойственных некультивируемым, но жизнеспособным формам чумного микроба [17], и вытянутых клеток, характерных для бактерий, подвергшихся стрессовым факторам [13]. С понижением температуры среднеквадратичная шероховатость поверхности клеток уменьшалась с (25 ± 5) до (20 ± 5) нм (см. рис. 4). Понижение температуры с 28 до 4 °С приводило к увеличению коэффициента уплощенности с $4,2 \pm 0,4$ до $5,7 \pm 0,4$, к увеличению индекса I с $2,3 \pm 0,2$ до $3,8 \pm 0,2$, что свидетельствовало о снижении ригидности клеточной стенки. Изменение пластичности и ригидности было статистически значимым со значением критерия Стьюдента $t = 2,65$ и $t = 5,30$ соответственно.

Корреляционный анализ показал прямую зависимость увеличения длины, ширины, объема, шероховатости клеток с увеличением температуры с 4 до 37 °С ($r_s = 0,875-1,0$) и обратную зависимость – для коэффициента уплощенности и индекса I ($r_s = -1,0$), что свидетельствовало о функциональной связи снижения пластичности и увеличения ригидности клеточной стенки с повышением температуры.

Природный штамм *Y. pestis* 1559, в отличие от вакцинного штамма, обладал гетерогенностью популяции на клеточном уровне с коэффициентом вариации линейных размеров клеток (длины) более 10%. В культуре наблюдались как типичные по морфологии клетки, так и вытянутые при всех исследуемых температурах (рис. 5–7).

Из литературных данных следует, что гетерогенность природных штаммов *Y. pestis* повышает выживаемость популяции бактерий в изменяющихся или неоднородных условиях среды, в организме хозяина и переносчика и при воздействии стрессовых факторов [19].

В то же время закономерности изменения морфологии клеток бактерий штамма *Y. pestis* 1559 при повышении и понижении температуры культивирования были аналогичны коллекционному штамму (см. рис. 4).

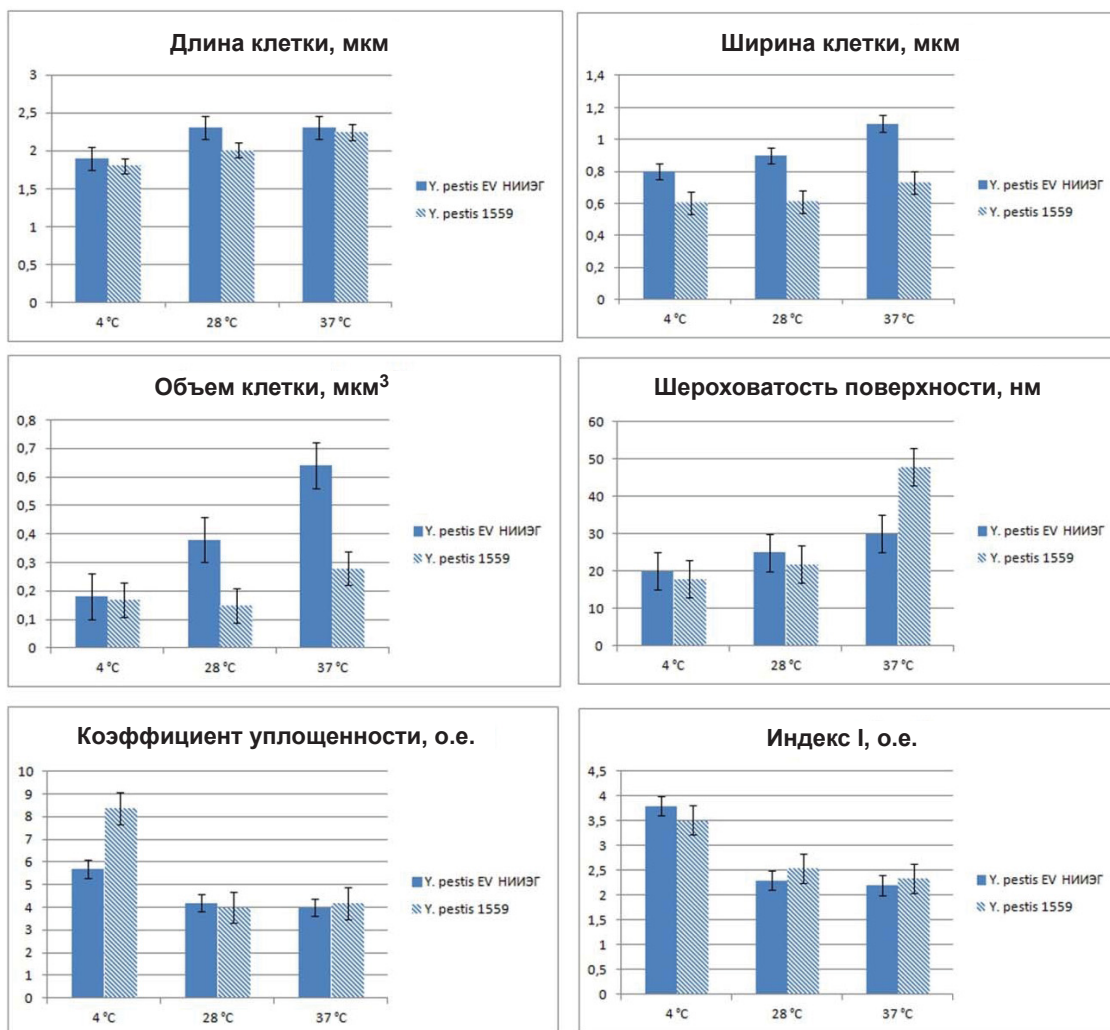


Рис. 4. Основные морфометрические параметры клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ, *Y. pestis* 1559, выращенных при температуре 4 °C, 28 °C, 37 °C

Увеличение температуры культивирования с 28 до 37 °C приводило к увеличению объема клеток в 1,9 раза, повышению шероховатости поверхности клеток с (22 ± 5) до (48 ± 11) нм (см. рис. 4). В результате повышения «складчатости» клетки увеличивалась площадь поверхности клеточной стенки и плотность липополисахарида [15], что, по-видимому, является одним из факторов адаптивной реакции бактерий чумного микроба на температуру, свойственную организму млекопитающего [14]. Кроме того, при температуре 37 °C во внеклеточном пространстве наблюдались рассеянные частицы и агрегаты (см. рис. 6), описанные ранее в литературе [15].

С понижением температуры культивирования с 28 до 4 °C среднеквадратичная шероховатость поверхности клетки уменьшалась с (22 ± 5) до (18 ± 3) нм (см. рис. 4), клетки становились более гладкими, покрытыми капсульным веществом (см. рис. 7).

При изменении температуры культивирования с 28 до 37 °C коэффициент уплотненности, характеризующий степень пластичности клетки, практически оставался на одном уровне $(4,0 \pm 0,2)$ и $(4,2 \pm 1,4)$ соответственно). В гипотермических условиях при температуре 4 °C пластичность клеток увеличивалась, что приводило к статистически достоверному увеличению коэффициента уплотненности с $4,0 \pm 0,2$ до $8,4 \pm 0,4$, $t = 9,84$ (см. рис. 4).

Индекс *I*, характеризующий ригидность клеточной стенки, с повышением температуры незначительно уменьшался с $2,5 \pm 0,1$ до $2,3 \pm 0,6$, что указывает на небольшое повышение ригидности. Понижение температуры до 4 °C приводило к достоверному увеличению индекса *I* с $2,5 \pm 0,1$ до $3,5 \pm 0,1$ ($t = 7,07$), что свидетельствовало о снижении ригидности клеточной стенки.

У природного штамма установлена прямая зависимость увеличения длины и ширины клеток от температуры ($r_s = 0,875-1,0$) и обратная – для индекса *I* ($r_s = -1,0$).

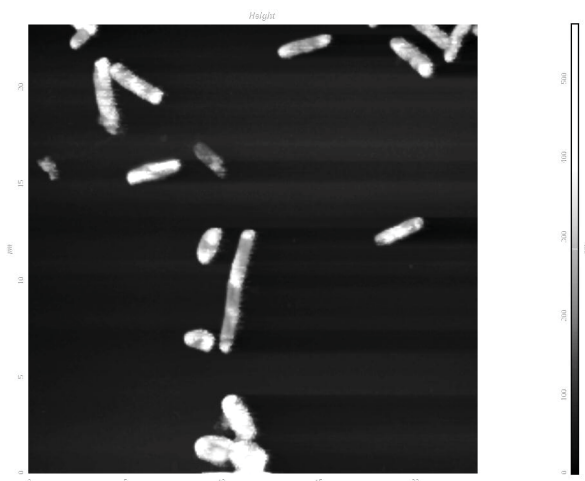


Рис. 5. АСМ штамма *Y. pestis* ssp. *altaica* 1559, выращенного при температуре культивирования 28 °С

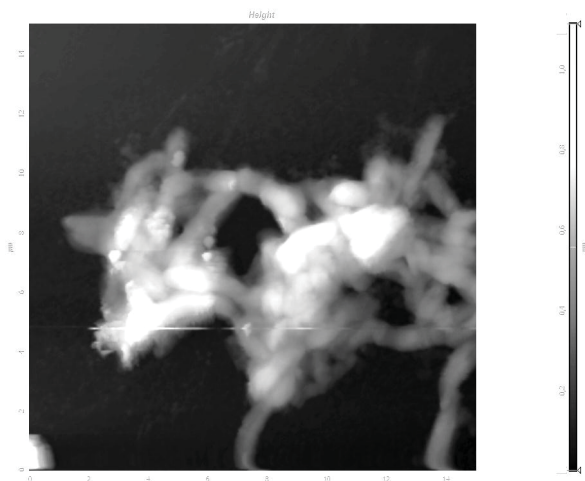


Рис. 6. АСМ штамма *Y. pestis* ssp. *altaica* 1559, выращенного при температуре культивирования 37 °С

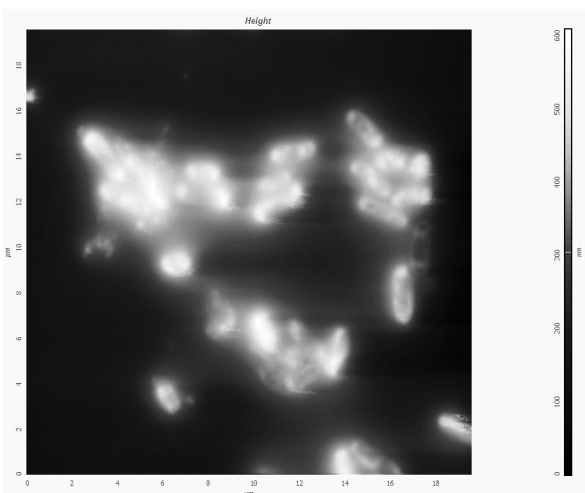


Рис. 7. АСМ штамма *Y. pestis* ssp. *altaica* 1559, выращенного при температуре культивирования 4 °С

Таким образом, общими тенденциями морфологических изменений при повышении температуры культивирования с 28 до 37 °С являются: увеличение объема клетки, шероховатости поверхности клетки, ригидности клеточной стенки как у авирулентного (лишенного области пигментации – одного из ведущих факторов вирулентности), так и у природного вирулентного штамма.

Понижение температуры до гипотермических значений в обоих случаях приводит к потере ригидности клеточной стенки, сглаживанию поверхности, увеличению пластичности, что свидетельствует о различных механизмах адаптации чумного микроба при культивировании *in vitro* при повышении и понижении температуры, регистрируемых с использованием АСМ. В то же время у природного штамма *Y. pestis*, выделенного из Горно-Алтайского высокогорного природного очага, выявлена гетерогенность клеточной популяции, которая выражается в наличии в популяции клеток с типичной для чумного микроба морфологией и вытянутых форм. При низкой температуре (4 °С) в популяции появляются округлые клетки, а все клетки покрыты капсульным веществом. Подобные изменения могут свидетельствовать об адаптации клеток чумного микроба к низким температурам в период зимней спячки носителей и требуют дальнейшего изучения для раскрытия механизмов выживания и стойкости чумного микроба в окружающей среде в межэпизоотический период, в том числе в зимнее время.

Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых / нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Список литературы

1. Васильченко А. С. Исследование морфофункциональной реакции бактерий на различные воздействия с использованием атомно-силовой микроскопии : автореф. дис. ... канд. биол. наук. Пермь, 2012. 22 с.
2. Ерохин П. С., Уткин Д. В., Осина Н. А., Бойко А. В., Кузнецов О. С., Куклев В. Е., Бугоркова Т. В. Современное состояние изучения ультраструктуры поверхности клеточной стенки микроорганизмов в условиях неблагоприятного воздействия факторов биотической и абиотической природы методами атомно-силовой микроскопии // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2016. Т. 16, вып. 2. С. 186–189.
3. Игнатов С. Г. Разработка и применение современных методов изучения и идентификации микроорганизмов с использованием бионанотехнологических подходов : автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Оболенск, 2010. 47 с.
4. Корнеев Д. В. Атомно-силовая спектроскопия одиночных вирусных частиц и их субъединиц : дис. ... канд. физ.-мат. наук. Кольцово, 2016. 109 с.
5. Краевский С. В. Атомно-силовая микроскопия аффин-



- ных взаимодействий в микробиологии : автореф. дис. ... канд. биол. наук. Оболенск, 2011. 22 с.
6. Никьян А. Н., Татлыбаева Е. Б. Использование атомно-силовой микроскопии при идентификации специфически маркированных молекул и клеток микроорганизмов // Вестн. ОГУ. 2015. № 13 (188). С. 186–189.
 7. Онищенко Г. Г., Кутырев В. В., Уткин Д. В. Правовые и теоретические предпосылки применения нанотехнологии и наноматериалов в диагностике, профилактике и лечении особо опасных инфекционных болезней // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2008. № 6. С. 93–97.
 8. Уткин Д. В., Кузнецов О. С., Ерохин П. С., Спицын А. Н., Волох О. А., Осина Н. А. Разработка методических подходов изучения возбудителей особо опасных инфекционных болезней методом атомно-силовой микроскопии // Проблемы особо опасных инфекций. 2012. № 2 (112). С. 62–64.
 9. Ерохин П. С. Атомно-силовая микроскопия как инструмент определения чувствительности бактерий к факторам биотической и абиотической природы : дис. канд. ... физ.-мат. наук. Саратов, 2015. 126 с.
 10. Плескова С. Н., Дубровин Е. В., Голубева И. С., Горшкова Е. Н., Пудовкина Е. Е. Нанотехнологическая АСМ-морфометрия бактериальных клеток // Вестник Нижегородского университета им. Н. И. Лобачевского. Сер. Физика твердого тела. 2013. № 2. С. 34–38.
 11. Chao Y., Zhang T. Optimization of fixation methods for observation of bacterial cell morphology and surface ultrastructures by atomic force microscopy // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2011. Vol. 92, № 2. P. 381–392.
 12. Артамонова М. Н., Потатуркина-Нестерова Н. И. Исследование топографии поверхности *Vacillus subtilis* в условиях гипотермии // Фундаментальные исследования. 2014. № 11. С. 1035–1039.
 13. Гуцина Ю. Ю., Олюнина Л. Н., Гончарова Т. А., Веселов А. П., Мацкова Ю. А., Ежеская М. А. Исследование морфологии поверхности клеток *Azotobacter chroococcum* в условиях гипертермии методом атомно-силовой микроскопии // Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования. 2005. № 5. С. 87–92.
 14. Чернядьев А. В., Бывалов А. А., Ананченко Б. А., Бушмелева Л. Г., Литвинцев С. Г. Морфологические особенности бактерий *Yersinia pseudotuberculosis* при различных температурных условиях // Изв. Коми науч. центра УрО РАН. 2012. Вып. 3 (11). С. 57–60.
 15. Wang C., Stanciu C. E., Ehrhardt C. J., Yadavalli V. K. The effect of growth temperature on the nanoscale biochemical surface properties of *Yersinia pestis* // Anal. Bioanal. Chem. 2016. Vol. 4086, № 20. P. 5585–5591.
 16. Sabatini D. D., Bensch K., Barrnett R. J. Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation // J. Cell Biol. 1963. Vol. 17. P. 19–58.
 17. Pawlowski D. R., Metzger D. J., Raslawsky A., Howlett A., Siebert G., Karalus R. J., Garrett S., Whitehouse C. A. Entry of *Yersinia pestis* into the Viable but Nonculturable State in a Low-Temperature Tap Water Microcosm // PLoS ONE. 2011. Vol. 6, № 3. P. 1–9. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017585>
 18. Кадникова Л. А., Копылов П. Х., Дентовская С. В., Анисимов А. П. Капсульный антиген чумного микроба // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 3. С. 201–218.
 19. Магданова Л. А., Голясная Н. В. Гетерогенность как адаптивное свойство бактериальной популяции // Микробиология. 2013. Т. 82, № 1. С. 3–13.

Образец для цитирования:

Уткин Д. В., Булгакова Е. Г., Ерохин П. С., Кузнецов О. С., Куклев В. Е., Осина Н. А. Исследование морфологических особенностей клеток бактерий *Yersinia pestis*, выращенных при различных температурных условиях, методом атомно-силовой микроскопии // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2019. Т. 19, вып. 1. С. 87–93. DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2019-19-1-87-93>

Study of the Morphological Features of the Cells of the Bacteria *Yersinia pestis*, Grown at Different Temperatures by Atomic Force Microscopy

D. V. Utkin, E. G. Bulgakova, P. S. Erokhin, O. S. Kuznetsov, V. E. Kuklev, N. A. Osina

Denis V. Utkin, <https://orcid.org/0000-0002-5903-7700>, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", 46 Universitetskaya Str., Saratov 410005, Russia, rusrapi@microbe.ru

Elena G. Bulgakova, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", 46 Universitetskaya Str., Saratov 410005, Russia, rusrapi@microbe.ru

Pavel S. Erokhin, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", 46 Universitetskaya Str., Saratov 410005, Russia, rusrapi@microbe.ru

Oleg S. Kuznetsov, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", 46 Universitetskaya Str., Saratov 410005, Russia, rusrapi@microbe.ru

Vasily E. Kuklev, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", 46 Universitetskaya Str., Saratov 410005, Russia, rusrapi@microbe.ru

Natalia A. Osina, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", 46 Universitetskaya Str., Saratov 410005, Russia, rusrapi@microbe.ru

Atomic force microscopy in the study of bacterial cells allows the determination of such morphological parameters as: length, width, cell thickness, its perimeter, cross-sectional area, volume and root mean square roughness of the cell surface, which depends on the degree of laying of peptidoglycan and density of lipopolysaccharide. The aim of this work was to study the changes in the morphological parameters of the cell and the cell surface of bacteria when the temperature conditions of the culture medium change on the *Y. pestis* model. Along with the traditional morphological parameters the coefficients characterizing the functional state of cells – plasticity, rigidity of the cell wall were determined. The measurements were carried out using standard methods of semi-contact atomic force microscopy and software analysis of AFM images. On the example of *Y. pestis* it is shown that an increase in the temperature of bacteria cultivation from 28 °C to 37 °C leads to an increase in the volume of the cell, the surface roughness of the cell,



and the rigidity of the cell wall. Lowering the cultivation temperature *in vitro* from 28 °C to 4 °C leads to loss of the rigidity of the cell wall, smoothing of the surface and increasing plasticity. The obtained results extend the information about the mechanisms of adaptation of the plague microbe in different temperature conditions.

Keywords: *Yersinia pestis*, bacterial cell, atomic force microscopy, morphometric analysis, surface structure, cultivation temperature.

Reference

- Vasilchenko A. S. *Issledovanie morfo-funktional'noj reakcii bakterij na razlichnyye vozdeystviya s ispol'zovaniem atomno-silovoj mikroskopii: avtoref. dis. ... kand. biol. nauk* [Study of morpho-functional reaction of bacteria on different effects using atomic force microscopy]. Tesis Diss. Cand. Sci. (Biol.). Perm, 2012. 22 p. (in Russian).
- Erokhin P. S., Utkin D. V., Osina N. A., Boyko A. V., Kuznetsov O. S., Kuklev V. E., Bugorkova T. V. Current state of Investigation of cell wall surface of microorganisms ultrastructure under the action of factors biotic and abiotic nature using methods of atomic force microscopy. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2016, vol. 16, iss. 2, pp. 186–189 (in Russian).
- Ignatov S. G. *Razrabotka i primeneniye sovremennykh metodov izucheniya i identifikatsii mikroorganizmov s ispol'zovaniem bio-nanotekhnologicheskikh podhodov: avtoref. dis. ...d-ra biol. nauk* [Development and application of modern methods of study and identification of microorganisms using bionanotechnological approaches]. Tesis Diss. Doct. Sci. (Biol.). Obolensk, 2010. 47 p. (in Russian).
- Korneev D. V. *Atomno-silovaya spektroskopiya odinonchnykh virusnykh chastic i ih sub"edinic: dis. ... kand. fiz.-mat. nauk* [Atomic force spectroscopy of single viral particles and their subunits]. Diss. Cand. Sci. (Phys.). Koltsovo, 2016. 109 p. (in Russian).
- Kraevsky S. V. *Atomno-silovaya mikroskopiya affinykh vzaimodeystviy v mikrobiologii: avtoref. dis. ... kand. biol. nauk* [Atomic force microscopy of affine interactions in microbiology]. Tesis Diss. Cand. Sci. (Biol.). Obolensk, 2011. 22 p. (in Russian).
- Nikiyan A. N., Tatibaeva E. B. The use of atomic force microscopy in the identification of specifically labeled molecules and microbial cells. *Bulletin of the Orenburg State University*, 2015, no. 13 (188), pp. 186–189 (in Russian).
- Onishchenko G. G., Kuttyrev V. V., Utkin D. V. Legal and theoretical background the application of nanotechnology and nanomaterials in the diagnosis, Joprevention and treatment of especially dangerous infectious diseases. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2008, no. 6, pp. 93–97 (in Russian).
- Utkin D. V., Kuznetsov O. S., Erokhin P. S., Spitsyn A. N., Volokh O. A., Osina N. A. Development of methodological approaches to the study of pathogens of particularly dangerous infectious diseases by atomic force microscopy. *Problems of particularly dangerous infections*, 2012, no. 2 (112), pp. 62–64 (in Russian).
- Erokhin P. S. *Atomno-silovaya mikroskopiya kak instrument opredeleniya chuvstvitel'nosti bakterij k faktoram bioticheskoy i abioticheskoy prirody: dis. kand. ... fiz.-mat. nauk* [Atomic force microscopy as a tool for determining the sensitivity of bacteria to factors of biotic and abiotic nature]. Dis. Cand. Sci. (Phys.). Saratov, 2015. 126 p. (in Russian).
- Pleskova S. N., Dubrovin E. V., Golubeva I. S., Gorshkova E. N., Pudovkina E. E. Nanotechnology AFM-morphometry of bacterial cells. *Bulletin of Nizhny Novgorod University. N. I. Lobachevsky. Series: Physics of solid state*, 2013, no. 2, pp. 34–38. (in Russian).
- Chao Y., Zhang T. Optimization of fixation methods for observation of bacterial cell morphology and surface ultrastructures by atomic force microscopy. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, vol. 92, no. 2, pp. 381–392.
- Artamonova M. N., Potaturkina-Nesterova N. I. Study of surface topography of *Bacillus subtilis* under hypothermia. *Fundamental research*, 2014, no. 11, pp. 1035–1039 (in Russian).
- Gushchina Y. Y., Alumina L. N., Goncharova T. A., Veselov A. P., Matskova Y. A., Ejevska M. A. A study of the morphology of the cells of *Azotobacterchroococcum* in conditions of hyperthermia by atomic force microscopy. *Journal of Surface Investigation: X-Ray, Synchrotron and Neutron Techniques*, 2005, no. 5, pp. 87–92 (in Russian).
- Chernyadjev V. A., Byvalov A. A., Ananchenko B. A., Bushmeleva L. G., Lytvynets S. G. Morphological features of bacteria *Yersinia pseudotuberculosis* under different temperature conditions. *News Komi scientific center of Ural department of the Russian Academy of Sciences*, 2012, vol. 3 (11), pp. 57–60 (in Russian).
- Wang C., Stanciu C. E., Ehrhardt C. J., Yadavalli V. K. The effect of growth temperature on the nanoscale biochemical surface properties of *Yersinia pestis*. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016, vol. 408, no. 20, pp. 5585–5591.
- Sabatini D. D., Bensch K., Barnett R. J. Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultra-structure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J. Cell Biol.*, 1963, vol. 17, pp. 19–58.
- Pawlowski D. R., Metzger D. J., Raslawsky A., Howlett A., Siebert G., Karalus R. J., Garrett S., Whitehouse C. A. Entry of *Yersinia pestis* into the Viable but Nonculturable State in a Low-Temperature Tap Water Microcosm. *PLoS ONE*, 2011, vol. 6, no. 3, pp. 1–9. DOI: 10.1371/journal.pone.0017585
- Kadnikova L. A., Kopylov P. H., Dentovskaya S. V., Anisimov A. P. Capsular antigen of *Yersinia pestis*. *Russian Journal of Infection and Immunity*, 2015, vol. 5, no. 3, pp. 201–218 (in Russian).
- Magdanova L. A., Golyasnaya N. V. Heterogeneity as an adaptive property of bacterial populations. *Mikrobiologiya* [Microbiology], 2013, vol. 82, no. 1, pp. 3–13 (in Russian).

Cite this article as:

Utkin D. V., Bulgakova E. G., Erokhin P. S., Kuznetsov O. S., Kuklev V. E., Osina N. A. Study of the Morphological Features of the Cells of the Bacteria *Yersinia pestis*, Grown at Different Temperatures by Atomic Force Microscopy. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2019, vol. 19, iss. 1, pp. 87–93 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2019-19-1-87-93>