



СТРУКТУРА ЭКЗОСПОРИУМА СПОР *BACILLUS CEREUS*

STRUCTURE OF EXOSPORIUM OF SPORES OF *BACILLUS CEREUS*

З.С.Плиева¹, мл. науч. сотр., (ORCID: 0000-0001-9765-8623), Т.А.Смирнова¹, д.б.н., вед. науч. сотр., (ORCID: 0000-0001-7121-635X), М.В.Зубашева¹, к.б.н., науч. сотр., (ORCID: 0000-0001-7330-7343), Ю.А.Смирнов¹, д.м.н., проф., вед. науч. сотр., (ORCID: 0000-0002-2215-5420), В.Г.Жуховицкий¹, к.м.н., руководитель лаборатории, (ORCID: 0000-0002-4653-2446), А.И.Ахметова^{2,3}, инженер НИИ ФХБ имени А.Н.Белозерского МГУ, ведущий специалист Центра перспективных технологий и Энергоэффективных технологий (ORCID: 0000-0002-5115-8030), И.В.Яминский^{2,3,4}, д.ф.-м.н., проф. физического и химического факультетов МГУ имени М.В.Ломоносова, вед. научн. сотр. ИНЭОС РАН, директор Энергоэффективных технологий, (ORCID: 0000-0001-8731-3947) / yaminsky@nanoscopy.ru
 Z.S.Plieva¹, Junior Researcher, T.A.Smirnova¹, Doct. of Sc. (Biology), Leading Scientist, M.V.Zubasheva¹, Cand. of Sci. (Biology), Researcher, Yu.A.Smirnov¹, Doct. of Sc. (Medicine), Prof., Leading Scientist, V.G.Zhukovitskiy¹, Cand. of Sc. (Medicine), Head of Laboratory, A.I.Akhmetova^{2,3}, Engineer of A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Leading Specialist of Advanced Technologies Center and of Energy Efficient Technologies, I.V.Yaminskiy^{2,3,4}, Doct. of Sc. (Physics and Mathematics), Prof. of Lomonosov Moscow State University, Physical and Chemical departments, Director of Energy Efficient Technologies, Leading Sci. of INEOS RAS

DOI: 10.22184/1993-8578.2020.13.7-8.426.432

Получено: 9.11.2020 г.

В окружающей среде бациллы *B. cereus* адаптированы к сапрофитному образу жизни. При определенных условиях они могут стать патогенами для человека и животных. Интерес к бациллам *B. cereus* связан с тем, что они являются причиной заболеваний желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), а также могут вызывать септицемию, эндокардит, пневмонию, менингит и др. Важным этапом жизненного цикла *B. cereus* является спорообразование. Споры *B. cereus* имеют специфические структуры, отсутствующие у вегетативных клеток и отвечающие за такие свойства спор, как термоустойчивость, резистентность к различным повреждающим факторам, адгезию к биотическим и абиотическим поверхностям. Получены данные о тонкой структуре экзоспориума *B. cereus* с помощью просвечивающей электронной микроскопии и компьютерного анализа изображений.

In the environment *B. cereus* bacilli are adapted to the saprophytic lifestyle. Under certain conditions, they can become pathogens for humans and animals. The interest in *B. cereus* bacilli is due to the fact that they cause diseases of the gastrointestinal tract (GIT), and can also cause septicemia, endocarditis, pneumonia, meningitis, etc. An important stage in the life cycle of *B. cereus* is sporulation. *B. cereus* spores have specific structures that are absent in vegetative cells, and are responsible for such properties of spores as thermal stability, resistance to various damaging factors, adhesion to biotic and abiotic surfaces. The data on the fine structure of the *B. cereus* exosporium were obtained using transmission electron microscopy and computer image analysis.

ВВЕДЕНИЕ

К спороспецифическим структурам относятся экзоспориум, споровая оболочка, внешняя мембрана споры, кортекс, внутренняя мембрана споры

и седцевина. У ряда бактерий с внешней стороны оболочки формируется экзоспориум, строение которого специфично для различных видов. Для *B. cereus* характерен экзоспориум в виде наружного тонкого

¹ ФГБУ "Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф.Гамалеи" МЗ РФ, Москва, Россия / The National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F.Gamaleya of the Ministry of Health of the Russian Federation.

² МГУ имени М.В.Ломоносова / Lomonosov Moscow State University, Physical and Chemical departments.

³ ООО НПП "Центр перспективных технологий" / Advanced Technologies Center.

⁴ ИНЭОС РАН, Москва, Россия / INEOS RAS, Russia.



чехла, окружающего спору [1]. Экзоспориум непосредственно вступает в контакт с внешней средой, в отличие от более глубоко расположенных структур. Экзоспориум играет роль в резистентности, адгезии, распространении спор, их взаимодействии с хозяином и в контроле прорастания. Экзоспориум имеет сложный химический состав, содержит белок (~52%), липиды и полисахариды [2].

Экзоспориум *B. cereus* снабжен характерными длинными выростами, которые имеют сходный с ним химический состав и общие антигены.

Экзоспориум визуализируется просвечивающей электронной (ПЭМ), сканирующей электронной (СЭМ) и атомно-силовой микроскопией (АСМ). Экзоспориум хорошо виден при использовании методов негативного контрастирования, ультратонких срезов. Строение экзоспориума было детально исследовано P. Gerhardt, E. Ribi [3], которые показали, что эта структура состоит из двух слоев: наружного, имеющего короткие волосовидные выросты, и внутреннего паракристаллического, гексагонально перфорированного базального слоя с отверстиями размером 76 Å от центра к центру [3]. Дальнейшие электронно-микроскопические исследования подтвердили эти данные.

Ранее с целью определения параметров упаковки морфологических субъединиц у экзоспориума *B. thuringiensis*, бацилл из группы *B. cereus*, мы проводили анализ электронно-микроскопических снимков методом оптической дифракции [4]. Обработка электронно-микроскопических снимков с помощью оптической дифракции проводится для объектов с периодической структурой. Техника оптической дифракции и фильтрации используется

для получения точной информации о строении регулярных слоев. Изображение экзоспориума на электронно-микроскопических снимках представляет собой результат наложения его верхнего и нижнего слоев. На дифрактограмме участка экзоспориума были обнаружены шесть двойных рефлексов, угол между которыми составлял 9°, указывающих на наличие двух слоев с гексагональной периодичностью, сдвинутых по отношению друг к другу на 9°. На фильтрованном изображении экзоспориума *B. thuringiensis* мы получили усредненные морфологические единицы с отверстиями в центре, что согласуется с представлением об экзоспориуме как о порозной структуре.

По данным Ball et al. [5], в экзоспориуме *B. cereus* имеются поры размером 23–34 Å. Авторами сделан вывод о том, что экзоспориум является полупроницаемым барьером, позволяющим проникать триггерам прорастания аланину или инозину, но не гидролитическим ферментам и антителам.

Ультраструктура экзоспориума способствует выполнению защитной функции благодаря избирательной способности пропускать низкомолекулярные вещества и задерживать высокомолекулярные.

Споры могут различаться по размеру экзоспориума. Оказалось, что и адгезивная способность спор варьируется от штамма к штамму. Наиболее активно контаминируют поверхности споры с небольшим экзоспориумом [6]. Споры по таким своим свойствам, как адгезивность и устойчивость к повреждающим факторам внешней среды, являются опасными для пищевой промышленности и медицины. Для оценки их способности контаминировать оборудование пищевой промышленности

INTRODUCTION

Spore-specific structures include exosporium, sporule membrane, the coat of spore, the cortex, the inner membrane of the spore, and the cervix. In a number of bacteria core, an exosporium is formed outside the shell and its structure is specific coat to various species. *B. cereus* is characterized by the exosporium in the form of an outer thin sheath surrounding the sporule [1]. The exosporium spore comes into direct contact with external

environment, in contrast to deeper structures. Exosporium plays a role in resistance, adhesion, sporule proliferation, host diffusion of spores, and germination control. Exosporium has a complicated chemical composition, it contains protein (~52%), lipids and polysaccharides [2].

The *B. cereus* exosporium has characteristic logg appendages that have a similar chemical composition and common antigens.

The exosporium is visualized by transmission electron

microscopy (TEM), scanning electron microscopy (SEM), and atomic force microscopy (AFM). The exosporium is clearly visible using the methods of negative contrasting and ultrathin sections. The exosporium structure was studied in detail by P. Gerhardt, E. Ribi [3] who showed that its structure consists of two layers: the outer one is short hair-like outgrowths, and the inner paracrystalline, hexagonally perforated basal layer with holes of 76 Å from center to



и медицинского инструментария представляет интерес изучить внешние структуры спор (экзоспориума и выростов) у штаммов *B. cereus* различного происхождения. Анализ строения поверхности спор важен и для выбора метода борьбы со спорообразующими бактериями.

Целью данного исследования является ультраструктурный анализ внешних споровых структур (экзоспориума) различных штаммов *B. cereus* методами электронной микроскопии, оптической дифракции и фильтрации. Результаты исследования важны для понимания роли экологической ниши, занимаемой штаммами *B. cereus* в формировании их фенотипических свойств. Известна способность *B. cereus* осваивать разнообразные экологические ниши и выживать в экстремальных условиях, что может повлечь нежелательные последствия для людей и животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали коллекционный штамм NCTC 8035 и природные штаммы (137\0719, 114\0719, 115\079, 131\079) *B. cereus*. Штаммы выращивали на агаризованном питательном бульоне LB при 28 °C в течение 96 ч. Клинические изоляты были получены из просветных фекалий пациентов с язвенным колитом (ЯК) в Государственном научном центре колопроктологии им. А.Н.Рыжих Минздрава России, обозначенные как *B. cereus* SCCC 1208 и *B. cereus* SCCC 19/16. Исследовали также следующие штаммы: штамм *B. cereus* 169, выделенный из отделяемого брюшной полости у больного с ЯК; штамм

B. cereus 177, выделенный из просветных фекалий; штамм *B. cereus* 172, выделенный из просветных фекалий; штамм *B. cereus* 214/18, выделенный из операционной раны пациента с ЯК; штамм *B. cereus* 239/18, выделенный из крови пациента с ЯК и подтвержденным диагнозом сепсиса; штамм *B. cereus* 223/18, выделенный из брюшной полости пациента с ЯК; штамм *B. cereus* 181, выделенный из операционной раны пациента с ЯК. Среда выращивания – кровяной агар. Штаммы пересевали на твердую питательную среду NBV и выращивали при 28 °C в течение 96 ч.

Бактерии через 96 ч культивирования смывали с плотной питательной среды, отмывали дистиллированной водой и фиксировали формалином. Для изучения спор методом негативного контрастирования суспензию спор наносили на медные сетки, покрытые формваровой пленкой и окрашивали 1%-ным водным раствором уранилацетата или 2%-ным водным раствором молибдата аммония.

Для получения ультратонких срезов образцы фиксировали по методу Ито-Карновски [7]. Затем материал фиксировали в 1%-ном OsO₄ растворе на 0,2 М какодилатном буфере и в 1%-ном растворе уранилацетата на 0,2 М малеатном буфере. Материал обезжировали в спиртах с концентрациями 50°, 70°, 96°, 100°. Далее помещали в смесь 100° спирта со смолой LR White, а затем в чистую смолу LR White. Материал переносили в желатиновые капсулы, которые помещали в термостат при 56 °C. Ультратонкие срезы готовили на ультратоме LKB III (LKB Bromma, Sweden) и контрастировали 1%-ным раствором уранилацетата в 70°-ном спирте и лимонно-кислым свинцом.

center [3]. The subsequent electron microscopic studies confirmed these data.

Earlier, in order to determine the packing parameters of morphological subunits in the *B. thuringiensis* exosporium, bacilli from the *B. cereus* group, we analyzed electron microscopic images by optical diffraction [4]. Processing of electron microscopic images using optical diffraction was carried out for objects with a periodic structure. Optical diffraction and filtering techniques are used to obtain accurate information about the structure of regular layers. The image of exosporium

on electron microscopic shots is the result of superposition of its upper and lower layers. The diffractogram of exosporium detected were six double reflections, the angle between them was 9°, which indicates presence of two layers with hexagonal periodicity, displaced relative to each other by 9°. On the filtered image of the *B. thuringiensis* exosporium, we obtained averaged morphological units with holes in the centre, which is consistent with the concept of exosporium as a porous structure.

According to Ball et al. [5], the exosporium of *B. cereus* has pores

23–34 Å in size. The authors concluded that the exosporium is a semipermeable barrier that allows penetration of germination triggers to alanine or inosine, but not to hydrolytic enzymes and antibodies.

The ultrastructure of the exosporium contributes to performance of the protective function due to the selective ability to pass low molecular weight substances and retain high molecular weight ones.

Spores can vary in the size of exosporium. It turned out that the adhesive ability of the spores varies from strain to strain. The most actively contaminated



Негативно окрашенные споры и срезы изучали в электронном микроскопе JEM 2100 (Jeol, Japan) при ускоряющем напряжении 160 кВ.

Анализ изображений проводился в программном обеспечении "ФемтоСкан Онлайн" (Центр перспективных технологий, Москва, www.nanoscopy.ru) [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Было проведено электронно-микроскопическое изучение спор штаммов как клинических изолятов, так и природных штаммов *B. cereus* методами негативного контрастирования и ультратонких срезов. На ультратонких срезах (рис.1) представлены зрелые споры штамма 293, выделенного из крови больного ЯК с характерной для *B. cereus* ультраструктурой. На поперечных срезах наблюдаются экзоспориум в виде тонкой волнистой линии, экзоспориальное пространство, отделяющее экзоспориум от споровой электронно-плотной оболочки, электронно-прозрачный кортекс, сердцевина в центре споры. Эти результаты дают общее представление о строении споры *B. cereus*. Все исследованные штаммы имели сходную ультраструктуру.

Однако при изучении срезов не удается рассмотреть тонкую структуру экзоспориума. С целью визуализации экзоспориума использовали метод негативного контрастирования. На рис.2 представлена спора штамма 8035, заключенная в электронно-прозрачный экзоспориум с выростами. Аналогичные данные были получены при изучении всех штаммов, использованных в работе. На рис.3 представлен фрагмент экзоспориума

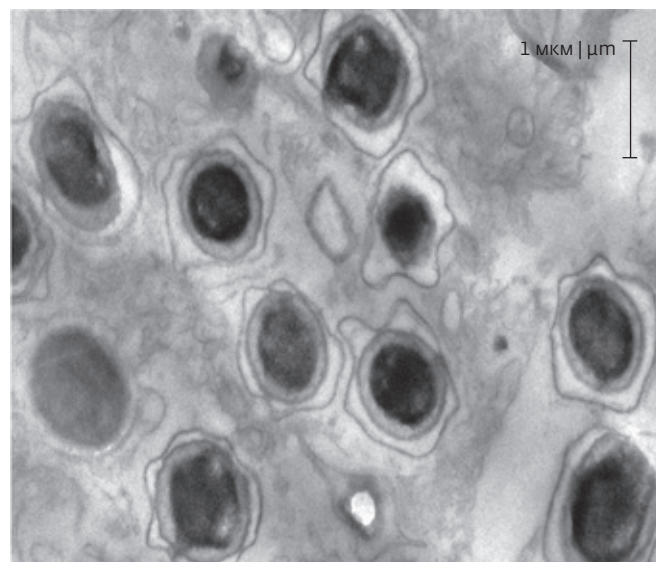


Рис.1. Ультратонкие срезы. Штамм *B. cereus* 239. Просвечивающая электронная микроскопия
Fig.1. Ultrathin slices. *B. cereus* strain 239. Transmission electron microscopy

того же штамма с гексагональной упаковкой субъединиц.

В рамках исследования было проведена фурье-фильтрация кристаллической структуры базального слоя экзоспориума в программном обеспечении "ФемтоСкан Онлайн" [8]. С помощью фурье-фильтрации возможно как сглаживание объектов, так и выделение мелких деталей на изображении. Фурье-фильтрация позволяет эффективно выделить

surfaces are spores with a small exosporium [6]. Disputes on such properties as adhesiveness and resistance to damaging environmental factors are dangerous for the food industry and medicine. To assess their ability to contaminate food industry equipment and medical instruments, it is interesting to study the external structures of spores (exosporium and appendages) in *B. cereus* strains of various origins. Analysis of the surface structure of spores is also important for choosing a method for combating spore-forming bacteria.

The aim of this study is the ultra-structural analysis of the external spore structures (exosporium) of various *B. cereus* strains by electron microscopy, optical diffraction and filtration. The study results are important for understanding the role of the ecological niche occupied by *B. cereus* strains in the formation of their phenotypic properties. The ability of *B. cereus* to occupy a variety of ecological niches and survive in extreme conditions is known, which can lead to undesirable consequences for humans and animals.

MATERIALS AND RESEARCH METHODS

The collection strain NCTC 8035 and natural *B. cereus* strains (137 \ 0719, 114/0719, 115 \ 079, 131 \ 079) were used in the work. The strains were grown on nutrient broth LB at 28 °C for 96 hours. Clinical isolates were obtained from the luminal feces of patients with ulcerative colitis (UC) at the A.N.Ryzhikh State Scientific Center of Coloproctology of the Ministry of Health of the Russian Federation, designated as SCCC 1208 *B. cereus* and *B. cereus* SCCC 19/16. The following strains

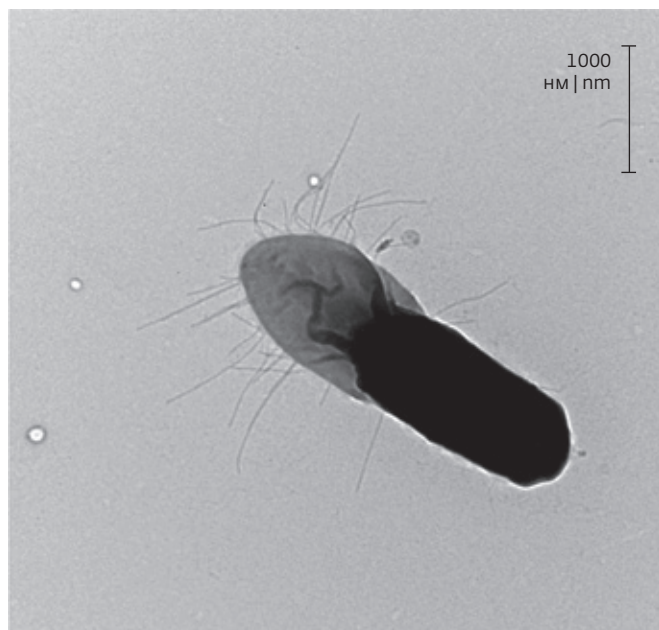


Рис.2. Штамм *B. cereus* 8035. Негативное контрастирование. Просвечивающая электронная микроскопия
Fig.2. *B. cereus* strain 8035. Negative staining. Transmission Electron Microscopy

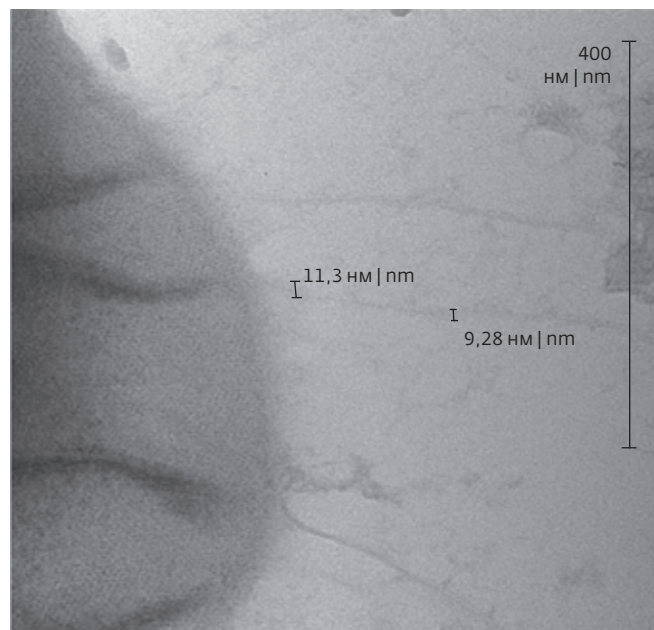


Рис.3. Экзоспориум и выросты. Штамм *B. cereus* 8035. Негативное контрастирование
Fig.3. Exosporium and appendages. *B. cereus* strain 8035. Negative staining

периодическую структуру на фоне общей зашумленности изображения. В частности, на рис.4 показан результат реализации фурье-фильтрации нижней левой области экзоспориума на рис.3 размером 110×120 мкм (рис.4а). Рис.4d демонстрирует изображение после исключения высокочастотных и низкочастотных шумов (см. рис. 4b и c), что

значительно облегчает восприятие рассматриваемой гексагональной структуры базального слоя экзоспориума (рис.5).

На рис.4d и 5 заметно муаровое изменение наблюдаемого контраста гексагональной упаковки слоев экзоспориума. Фактически, на изображении представлено наложение двух слоев

were also investigated: strain 169 *B. cereus* isolated from the discharge of the abdominal cavity of a patient with UC; *B. cereus* strain 177 isolated from luminal feces; *B. cereus* strain 172 isolated from luminal feces; *B. cereus* strain 214/18, isolated from the surgical wound of a patient with UC; *B. cereus* strain 239/18, isolated from the blood of a patient with UC and a confirmed diagnosis of sepsis; *B. cereus* strain 223/18 isolated from the abdominal cavity of a patient with UC; *B. cereus* strain 181 isolated from an operating wound of a patient with UC. The growing medium

is blood agar. The strains were subcultured onto solid nutrient medium NBY and grown at 28 °C for 96 hours.

After 96 hours of cultivation, bacteria were washed off from a dense nutrient medium, rinsed with distilled water, and fixed with formalin. To study spores by negative contrasting, a spore suspension was applied to copper grids covered with a formvar film and stained with 1% aqueous solution of uranyl acetate or 2% aqueous solution of ammonium molybdate.

To obtain ultrathin sections, the samples were fixed using

the Ito-Karnovski method [7]. Then the material was fixed in 1% OsO_4 solution in 0.2 M cacodylate buffer and in 1% uranyl acetate solution in 0.2 M maleate buffer. The material was dehydrated in alcohols with concentrations of 50°, 70°, 96°, 100°. Then it was placed in a mixture of 100° alcohol with LR White resin, and then in pure LR White resin. The material was transferred into gelatin capsules, which were placed in a thermostat at 56 °C. Ultrathin sections were prepared on an LKB III ultratome (LKB Bromma, Sweden) and

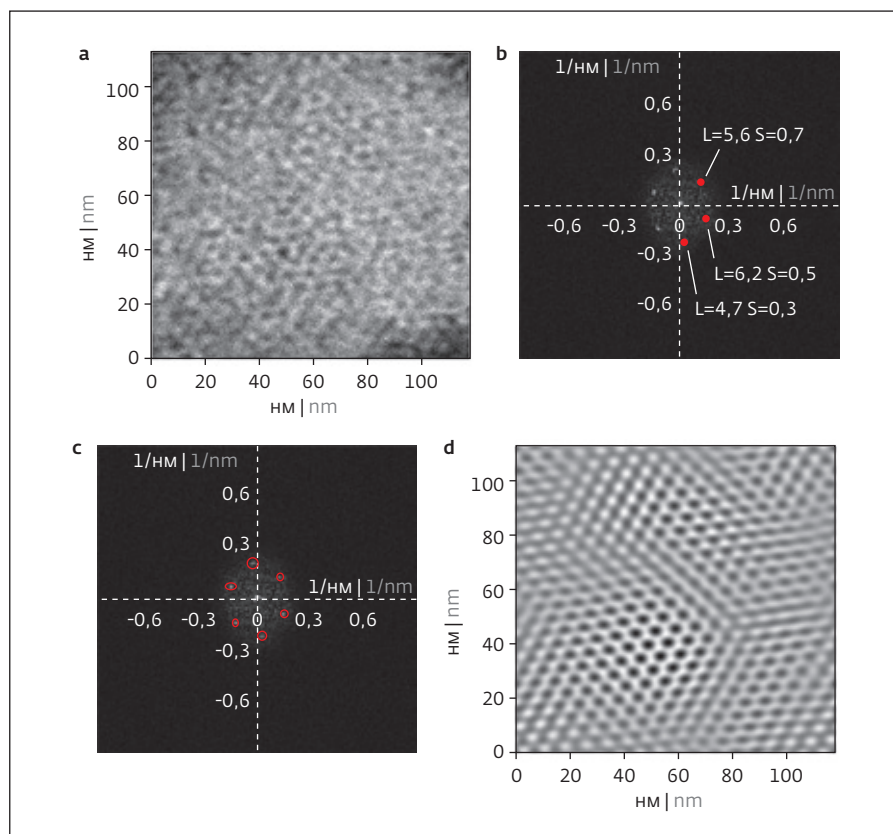


Рис.4. Фурье-преобразование изображения в ПО "ФемтоСкан Онлайн". а – выделенный фрагмент из рис.3; б – измерение периода рефлексов; с – удаление шумовой составляющей за границей выделенных красной пунктирной линией; д – выделенный фрагмент после фурье-фильтрации

Fig.4. Fourier transform of an image in FemtoScan Online software. a – selected fragment from Fig.3; b – measurement of the reflex period; c – removal of the noise component outside the highlighted red dotted line; d – selected fragment after Fourier filtering

экзоспориума – верхнего и нижнего, повернутых друг относительно друга на небольшой угол. В соответствии с сечением, представленным на рис.5, наблюдаемое характерное расстояние между порами одного слоя экзоспориума составляет величину около 6 нм.

Таким образом, с помощью просвечивающей электронной микроскопии и компьютерного анализа изображений получены данные о тонкой структуре экзоспориума *B. cereus*. Представлены фрагменты экзоспориума после фурье-фильтрации, демонстрирующие очищенную от шумов гексагональную структуру, характерную для *B. cereus*.

Работа Яминского И.В. выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20-12-00389), работа Ахметовой А.И. – при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 20-32-90036 и № 21-58-10005).

contrasted with 1% uranyl acetate solution in 70° alcohol and lead citrate. Negatively stained spores and sections were studied using a JEM 2100 electron microscope (Jeol, Japan) at an accelerating voltage of 160 kV.

The images were analyzed using the FemtoScan Online software (Center for Advanced Technologies, Moscow, www.nanoscopy.ru) [8].

CONCLUSIONS

An electron microscopic study of the spores of strains of both clinical isolates and natural strains of *B. cereus* was carried out using

negative contrast and ultrathin sections. Ultrathin sections (Fig.1) show mature spores of strain 239 isolated from the blood of a patient with UC with an ultrastructure characteristic of *B. cereus*. On transverse sections, an exosporium is observed in the form of a thin wavy line, an exospore space separating the exosporium space from the spore electron-dense shell, an electron-transparent coat, and a core in the center of the spore. These results provide an overview of the structure of the *B. cereus* spore. All studied strains had a similar ultrastructure.

However, when studying sections, it is not possible to consider the fine structure of the exosporium. In order to visualize the exosporium, the negative contrasting method was used. Figure 2 shows a spore of strain 8035 enclosed in an electron-transparent exosporium with appendages. Similar data were obtained when studying all the strains. Figure 3 shows a fragment of an exosporium of the same strain with a hexagonal packing of subunits.

As part of the study, Fourier filtration of the crystal structure of the exosporium basal

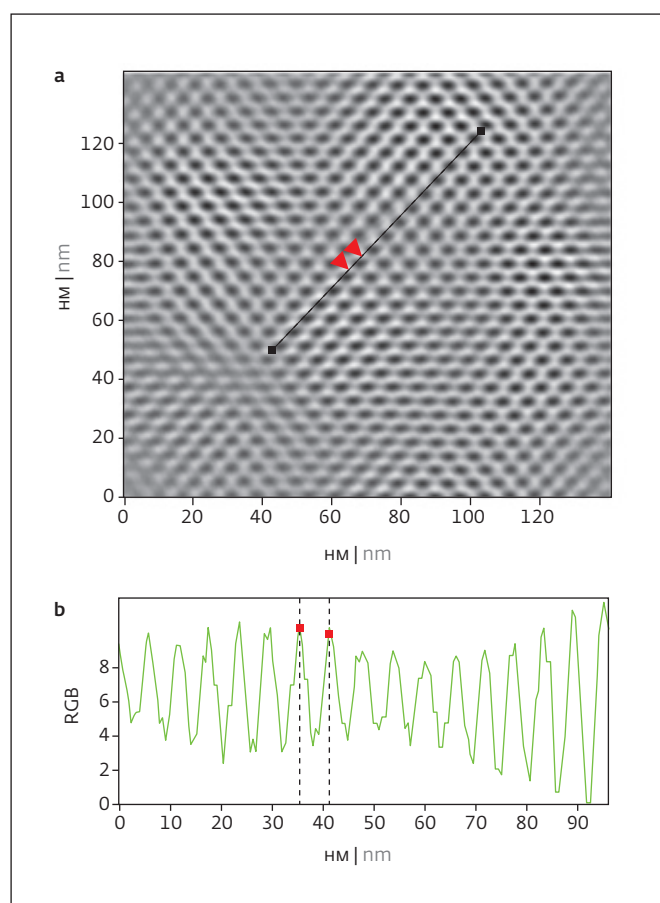


Рис.5. а – изображение после фурье-фильтрации; б – выбор сечения, выделенного красной линией, на изображении после фурье-фильтрации

Fig.5. a – image after Fourier filtering; b – selection of the section highlighted by the red line in the image after Fourier filtering

layer was carried out in the FemtoScan Online software [8]. With the help of Fourier filtering, it is possible both to smooth objects and to highlight small details in the image. Fourier filtering makes it possible to effectively isolate the periodic structure against the background of the general image noise. In particular, Fig.4 shows the result of implementation of Fourier filtering of the lower left region of the exosporium in Fig.3 measuring $110 \times 120 \mu\text{m}$ (Fig.4a). Fig. 4d shows the image after elimination of high-frequency and

low-frequency noise (see Fig. 4b and c), which greatly facilitates perception of the considered hexagonal structure of the exosporium basal layer (Fig.5).

In Figures 4d and 5, a moire change in the observed contrast of the hexagonal packing of exosporium layers is noticeable. In fact, the image shows the superposition of two layers of the exosporium – upper and lower, rotated relative to each other at a small angle. According to the section shown in Fig.5, the observed characteristic gap between the pores of one layer of the exosporium is about 6 nm.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

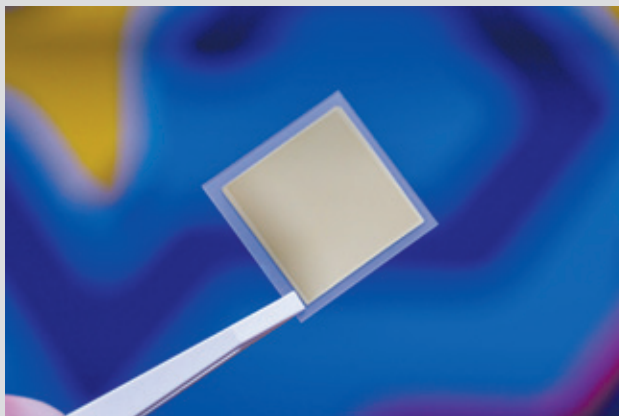
1. **Stewart G.C.** The Exosporium Layer of Bacterial Spores: a Connection to the Environment and the Infected Host. *Microbiol Mol Biol Re*, v. 79 (4) (2015), pp. 437–457.
2. **Matz L.L., Beaman T.C., Gerhardt P.** Chemical composition of exosporium from spores of *Bacillus cereus*. *J Bacteriol.* 101 (1970), pp. 196–201.
3. **Gerhardt P., Ribi E.** Ultrastructure of the exosporium enveloping spores of *Bacillus cereus*. *J. of Bacteriology.* 88 (6) (1964), pp. 1774–1789.
4. **Smirnova T.A., Mikhailov A.M., Tiurin V.S., Azizbekian R.R.** Ultrastructure of the bacterial spores and crystals of various *Bacillus thuringiensis* serotypes. *Mikrobiologiya.* 53 (1984), pp. 455–462.
5. **Ball D.A., Taylor R., Todd S.J.** et al. Structure of exosporium and sublayers of spores of the *Bacillus cereus* family revealed by electron crystallography. *Molecul. microbiol.* 68(4) (2008), pp. 947–958.
6. **Tauveron G., Slomianny C., Henry C., Faille C.** Variability among *Bacillus cereus* strains in the spore surface properties and influence on their ability to contaminate food surface equipment. *Int. J. Food Microbiol*, 110 (2006), pp. 254–262.
7. **Ito S., Karnovsky M.** Formaldehyde glutaraldehyde fixatives containing trinitrocompound. *J. Cell Biol*, v. 39, (1969), pp. 168a–169a.
8. **Yaminsky I.V., Akhmetova A.I., Meshkov G.B.** FemtoScan Online software and visualization of nanoobjects in high resolution microscopy. *Nanoindustry*, 11 (6 (85)) (2018), pp. 414–416.

Thus, using transmission electron microscopy and computer analysis of images, data on the fine structure of the *B. cereus* exosporium were obtained. Fragments of the exosporium after Fourier filtering are presented, demonstrating a noise-free hexagonal structure characteristic of *B. cereus*. ■

This work of I.V.Yaminsky was supported by the Russian Science Foundation, project No. 20-12-00389, and A.I.Akhmetova within the projects No. 20-32-90036 and No. 21-58-10005. of the Russian Foundation for Basic Research.



ЭФФЕКТ БЕНДЖАМИНА БАТТОНА: СОЗДАНЫ СЕРЕБРЯНЫЕ ПЛЕНКИ, УЛУЧШАЮЩИЕ СВОИ СВОЙСТВА С ТЕЧЕНИЕМ ВРЕМЕНИ



В НОЦ Функциональные Микро/Наносистемы на базе МГТУ им. Н.Э.Баумана и ФГУП "ВНИИА им. Н.Л.Духова" созданы эпитаксиальные серебряные пленки, улучшающие свои свойства с течением времени. Уникальными долгожителями стали пленки металлов, осажденные по запатентованной SCULL-технологии НОЦ ФМН. Высокое качество структуры SCULL-пленок останавливает процесс деградации, свойственный серебру.

Серебро и золото – наиболее востребованные в оптике и плазмонике материалы, спектр использования которых охватывает интегральные плазмонные устройства, элементы вычислительных систем и различные функциональные покрытия. Серебро имеет самые низкие оптические потери в видимом и ближнем инфракрасном диапазоне длин волн, но при этом имеет большой недостаток: значительное ухудшение свойств с течением времени. Исследование механизмов деградации серебра и поиск решений для ее предотвращения являются важной и актуальной научной задачей.

На протяжении двух лет команда ученых НОЦ ФМН и ИТПЭ РАН исследовала монокристаллические пленки серебра толщиной от 25 до 70 нм, нанесенные на кремниевые подложки. С применением методов спектроскопической эллипсометрии, сканирующей электронной микроскопии сверхвысокого разрешения и стилусной профилометрии были исследованы морфология поверхности, кристаллическая структура и оптические характеристики металла. Характеристики серебряных пленок измерялись в стандартных лабораторных условиях.

Следы деградации пленок проявились спустя 7–19 месяцев после осаждения: на поверхности металлов возникли объемные структуры, разрывы и прочие дефекты. При этом в химическом составе образцов присутствия связей серебра

с активными химическими элементами (AgCl , Ag_2S , Ag_2O , Ag_2CO_3) обнаружено не было, что говорит о том, что интенсивность деградации пленок определяется другими факторами, в числе которых уровень шероховатости металлов, количество дефектов на их поверхности, а также наличие внутренних остаточных напряжений, возникших в процессе роста структуры.

Наилучшую стабильность с точки зрения сохранения своих свойств продемонстрировали пленки монокристаллического серебра толщиной 35–50 нм, осажденные по запатентованной SCULL-технологии. Более того, по результатам исследований доказано, что со временем они улучшают свою структуру с одновременным изменением морфологии поверхности.

"SCULL-технология позволяет нам создавать практически структурно идеальные тонкие пленки металлов с шероховатостью поверхности на уровне диаметра атома самого материала – 90–200 пм. Такая структура обеспечивает не только уникальные свойства металла, но и его стабильность с течением времени. Нам удалось справиться с одним из недостатков серебра – быстрым "старением", а значит, повернуть время вспять и создать сверхкачественный материал для применения в области нанофотоники, оптики, квантовых вычислений и коммуникаций", – отметил Илья Родионов, директор НОЦ ФМН.

"На основе SCULL-технологии нам уже удалось поставить ряд мировых рекордов, в частности, с ИСАН РАН достичь максимальной теоретически предсказанной длины распространения поверхностного плазмона 200 мкм и совместно с Purdue University создать самый яркий однофотонный источник (скорость излучения – 35 миллионов одиночных фотонов в секунду), работающий при комнатной температуре. Стабильность пленок снимает ограничения по времени работы с ними и позволяет создавать стабильные фотонные устройства на их основе", – отметил Александр Бабурин, руководитель группы нанофотоники НОЦ ФМН.

Результаты проведенной работы дали исследователям возможность предложить механизм изменения характеристик металлических тонких пленок, связанный с распределением внутренних напряжений и склонностью серебряных слоев к несмачиванию поверхности и образованию капель. В рамках предложенного командой НОЦ ФМН и ИТПЭ РАН механизма объясняются характер зависимости шероховатости и оптических характеристик пленок разных толщин от времени.

Результаты исследований представлены в публикации *Epitaxial Silver Films Morphology and Optical Properties Evolution over Two Years* в журнале *Coatings*.

По материалам ОЦ Функциональные Микро/Наносистемы

НЕЙРОСЕТЬ АНАЛИЗИРУЕТ НАНОЧАСТИЦЫ ПО МИКРОФОТОГРАФИЯМ

Впервые обучить нейросеть поиску и анализу наночастиц с помощью микроскопа смогли ученые НИЯУ "МИФИ". Предложенный метод обучения нейросетей позволит отказаться от ручной обработки микрофотографий. Это поможет не только сократить время исследования, но и увеличить количество анализируемых частиц от сотен единиц до десятков тысяч. Исследование ученых показало, что эффективно обучать нейросети анализу изображений со сканирующего электронного

микроскопа можно не размечая реальные микрофотографии вручную, а генерируя имитирующие их изображения на компьютере. В ходе исследования использовалась нейросеть с архитектурой *RetinaNet*. В дальнейшем научный коллектив намерен использовать этот же подход для классификации наночастиц по форме – пока что это также полностью ручная работа.

По материалам: *Ultramicroscopy*