

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Герасимов В.Н.¹, Маринина Н.Н.¹, Харсеева Г.Г.², Щербатая О.С.²

ВОЗМОЖНОСТИ ТРАНСМИССИОННОЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ В ОЦЕНКЕ КАЧЕСТВА КЛЕТОК БАКТЕРИЙ И МИКРОБНОЙ ПОПУЛЯЦИИ

¹ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, 142279, п. Оболенск, г.о. Серпухов, Московская область, Россия;

²ФГБОУ ВО Ростовский государственный медицинский университет Минздрава РФ, 344022, Ростов-на-Дону, Россия

Определение изменений морфоструктуры микроорганизмов под влиянием антибиотиков, дезинфектантов, биоцидов, физических и химических агентов проводят с помощью метода визуализации ультратонких срезов в трансмиссионном электронном микроскопе. Цель – разработка методических приёмов экспрессной подготовки и визуализации ультраструктуры бактерий в трансмиссионном электронном микроскопе для выявления структурных повреждений клеток и оценки качества микробной популяции. Разработана методика ускоренной подготовки образцов для визуализации ультратонкой структуры бактерий и диагностики структурных повреждений клеток в трансмиссионном электронном микроскопе. Использование этого метода позволит более эффективно исследовать механизмы инактивации микроорганизмов на разных этапах контакта с антибиотиками, дезинфектантами, биоцидами, включая различные стрессовые, повреждающие и летальные физические и химические воздействия.

Ключевые слова: трансмиссионная электронная микроскопия; ультратонкие срезы бактерий; фиксация; качество бактериальной популяции.

Для цитирования: Герасимов В.Н., Маринина Н.Н., Харсеева Г.Г., Щербатая О.С. Возможности трансмиссионной электронной микроскопии в оценке качества клеток бактерий и микробной популяции. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (4): 237-243. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-4-237-243>

Для корреспонденции: Харсеева Галина Георгиевна, проф., зав. каф. микробиологии и вирусологии № 2; e-mail: galinagh@bk.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование проводилось за счет средств Федерального бюджета в рамках государственного задания «Маркёры патогенности и антибиотикорезистентности условно-патогенных микроорганизмов, связанных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта».

Поступила 02.02.2022

Принята к печати 25.02.2022

Опубликовано 17.04.2022

Gerasimov V.N.¹, Marinina N.N.¹, Kharseeva G.G.², Shcherbataya O.S.²

POSSIBILITIES OF TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY IN ASSESSING THE QUALITY OF BACTERIAL CELLS AND MICROBIAL POPULATION

¹Federal Budgetary Institution of Science State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, 142279 Obolensk, Russia;

²Federal State Educational Institution of Higher Education «Rostov State Medical University» Ministry of Health of Russia, 344022, Rostov-on-Don, Russia

Determination of changes in the morphostructure of microorganisms under the influence of antibiotics, disinfectants, biocins, physical and chemical agents is carried out using the method of visualization of ultrathin sections in a transmission electron microscope. The aim is to develop methodological techniques for express preparation and visualization of the ultrastructure of bacteria in a transmission electron microscope to detect structural damage to cells and assess the quality of the microbial population. A technique of accelerated sample preparation for visualization of the fine structure of bacteria and diagnosis of structural damage to cells in a transmission electron microscope has been developed. The use of this method will make it possible to more effectively investigate the mechanisms of inactivation of microorganisms at different stages of contact with antibiotics, disinfectants, biocines, including various stressful, damaging and lethal physical and chemical effects.

Key words: transmission electron microscopy; ultrathin sections of bacteria; fixation; quality of bacterial population.

For citation: Gerasimov V.N., Marinina N.N., Kharseeva G.G., Shcherbataya O.S. The possibilities of transmission electron microscopy in assessing the quality of bacterial cells and microbial population. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (4): 237-243 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-4-237-243>

For correspondence: Kharseeva Galina G., Professor, Head of the Department of Microbiology and Virology № 2; e-mail: galinagh@bk.ru

Information about authors:

Gerasimov V.N., <http://orcid.org/0000-0002-0473-7785>;
Marinina N.N., <https://orcid.org/0000-0002-9001-6668>;
Kharseeva G.G., <http://orcid.org/0000-0002-6226-2183>;
Shcherbataya O.A., <http://orcid.org/0000-0002-0507-3853>.

Conflict of interest. *The authors declare no conflict of interests.*

Acknowledgment. *The study was conducted at the expense of the Federal budget within the framework of the state task «Markers of pathogenicity and antibiotic resistance of opportunistic microorganisms associated with inflammatory diseases of the respiratory tract».*

Received 02.02.2022

Accepted 25.02.2022

Published 17.04.2022

Введение. Способность микроорганизмов к выживанию в условиях широкого использования антимикробных и дезинфицирующих препаратов является серьёзной проблемой здравоохранения во всем мире. Обладая высокой степенью изменчивости, микробные патогены приобретают устойчивость и, зачастую множественную, к лекарственным препаратам и дезинфектантам [1]. Для определения механизмов формирования этого явления используют фенотипические и молекулярно-биологические методы. Однако под воздействием антимикробных препаратов (АМП) происходят изменения не только указанных свойств, но и строения бактерий [2]. Определение изменений морфоструктуры микроорганизмов под влиянием АМП, дезинфектантов, биоцинов, физических и химических агентов проводят с помощью визуализации ультратонких срезов в трансмиссионном электронном микроскопе [3]. Электронно-микроскопическое исследование позволяет выявить изменения структуры микроорганизмов, свидетельствующие о характере протекающих в них деструктивных процессов [4]. Такие изменения возможно определять как у отдельных микробных клеток, так и при исследовании репрезентативной выборки микроорганизмов. Метод ультратонких срезов является одним из основных способов пробоподготовки биологических объектов при проведении трансмиссионной электронной микроскопии. С его помощью раскрыты особенности ультратонкой структуры клеток и надмолекулярных комплексов, выявлены структурные основы многих биохимических и физиологических процессов, механизмы патологических изменений клеток [5]. Этот метод позволяет находить самые тонкие нарушения ультраструктуры микроорганизмов (при больших увеличениях) и даёт возможность работать с достаточно большой выборкой популяции микробов (при малых увеличениях). Особую важность для оценки качества микроорганизмов на различных стадиях биотехнологических процессов (разработка и испытание вакцин, биопрепаратов, дезинфицирующих средств) имеет использование экспрессных методов визуализации их ультраструктуры. Большое значение имеет и разработка количественных способов оценки структуры как отдельных микроорганизмов, так и микробной биомассы в целом на любых стадиях изучения [6].

Цель исследования – разработка методических приёмов экспрессной подготовки и визуализации ультраструктуры бактерий в трансмиссионном электронном микроскопе для выявления структурных повреждений клеток и оценки качества микробной популяции.

Материал и методы. Использованы штаммы микроорганизмов: *Corynebacterium diphtheriae gravis tox⁺* № 665, полученный из ГИСК им. Л.А. Тарасевича,

Escherichia coli K12, *Staphylococcus aureus 906*, *Bacillus thuringiensis 52B*, полученные из Государственной коллекции микроорганизмов ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора. Штамм *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 665 культивировали на кровяно-теллуритовом и 20% сыровоточном агаре; *E. coli K-12*, *S. aureus 906* – на мясо-пептонном агаре. Споры бактерий *B. thuringiensis 52* получали по методике споруляции вегетативных клеток [7].

Для исследования ультраструктуры бактерий и спор в электронном микроскопе микробы препарировали и фиксировали образцы биомассы по общепринятой методике [6, 8, 9]. Фиксацию проводили с помощью 4% раствора глутарового альдегида в 0,2 М Na-какодилатном буфере (рН 7,2) в течение ночи при температуре +4° С. Дополнительную фиксацию осуществляли в растворе четырёхоксида осмия на буфере Райтер-Келленбергера в течение ночи при температуре +4° С. После фиксации и отмывки в буфере клетки бактерий дегидратировали по 10 мин в растворах этилового спирта возрастающей концентрации (30%, 50%, 70%, 95%) и 20 мин в абсолютном спирте при его трёхкратной смене. Далее образцы пропитывали смесями абсолютного этанола и аралдита (соотношение 3:1; 1:1; 1:3) при +37° С в течение трёх суток и выдерживали в чистом аралдите 1,5-2 ч при температуре +37° С. Затем образцы заливали аралдитом и полимеризовали при температуре +40° С в течение ночи; при температуре +60° С – одни сутки; при температуре +90° С – двое суток [6]. Срезы фиксированной биомассы бактерий готовили с использованием стального ножа на ультрамикротоме Ultracut (Reichert Jung, Австрия). Полученные срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца, просматривали в трансмиссионном электронном микроскопе TecnaiG2 SpiritBioTWIN (FEI, Голландия, Чехия) при ускоряющем напряжении 120 кВ и увеличении x10 000-100 000. Съёмку электронно-микроскопических изображений производили с помощью высококонтрастной широкоугольной CCD камеры высокого разрешения GatanOriusSC200W 120 kV, CCD камеры высокого разрешения Gatan Orius SC 1000B 200kV. Обработку фотоснимков производили с помощью программ TecnaImaging and Analysis, Gantandigitalmicrograph.

Результаты. При визуализации в трансмиссионном электронном микроскопе ультратонких срезов бактерий штамма *E. coli K-12*, фиксированных и препарированных по общепринятой методике [6], выявлены особенности ультраструктуры этих микроорганизмов (рис. 1, а). Клеточная оболочка включает в свой состав извилистую трёхслойную наружную мембрану (толщина 10 нм). Слой пептидогликана (толщина 3-7 нм) имеет гомогенную структуру. В трёхслойной цитоплазматической мембране

(толщина 7,5 нм) имеются неглубокие инвагинации. Цитоплазма бактерий представлена гомогенной структурой со средней электронно-оптической плотностью и гранулярными образованиями размером 20-30 нм. Внутритоплазматический мембранный аппарат слабо развит и содержит кольца, петли и каналцы мембранного происхождения. Нуклеоид занимает центральную часть цитоплазмы и представлен клубком тонких фибрилл хроматина, распределённых в электронно-светлой нуклеоплазме.

Учитывая, что общепринятая методика пробоподготовки для трансмиссионной электронной микроскопии достаточно трудоёмка и длительна (от 5 до 10 сут), для выявления структурных повреждений клеток бактерий и оценки качества микробной популяции предложен ускоренный метод экспрессной подготовки и визуализации ультраструктуры бактерий в трансмиссионном электронном микроскопе. Согласно этому методу, в состав префиксирующей смеси входят 25% глутаровый альдегид (2,0-2,5%), уранилацетат (0,5-0,6%), CaCl₂ (0,11-0,12%), ацетат-вероналовый буфер pH 6,0 (96,78-97,34%) (см. таблицу). Бактерии первоначально префиксируют в течение 5-10 мин в указанной смеси. Затем к ней добавляют 3-4% раствор четырёхокисного осмия в соотношении 1:1 (объём/объём) и проводят дофиксацию в течение 55 мин при +22°C. Суспензию микробов центрифугируют, осадок обезвоживают в градиенте концентрации этанола: 50% – 10 мин, 70% – 10 мин, 80% – 10 мин, 90% – 10 мин, 95% – 10 мин и 100% (абсолютный этанол) 3 смены по 20 минут. Образцы пропитывают в трёх сменах абсолютного этанола и аралдита, либо пропиленоксида и эпона в соотношениях 3:1, 1:1, 1:3 при +37°C по 1,5 ч в каждой, затем переносят в чистый аралдит (эпон) и выдерживают в вакууме (10⁻² зторр) 1,5 ч при +37°C. Образцы помещают в свежую смолу и полимеризуют при +90°C в течение 14-24 часов. Разработанная ускоренная методика позволяет в течение 24-48 ч подготовить клетки к ультраструктурному анализу. Дальнейшие операции (изготовление срезов, дополнительное контрастирование и просмотр в электронном микроскопе) проводят как обычно.

Изучение «ускоренно приготовленных» срезов в трансмиссионном электронном микроскопе показало, что тонкая структура исследуемых клеток качественно сохранена. Для проверки универсальности методики исследованы грамположительные (*S. aureus 906*), грамотрицательные (*E. coli K12*) бактерии и споры бактерий *B. thuringiensis 52*. Электронограммы ультратонких срезов бактерий, подготовленных общепринятым способом, и по методике ускоренной фиксации и препарирования клеток представлены на рис. 1. Подобранные условия позволяют выявить все основные элементы ультраструктуры, как вегетативных, так и споровых форм микроорганизмов (см. рис. 1, б, в, г).

При визуализации ультратонкой структуры, бактериальные клетки подразделяли на три основные группы: интактные или неповреждённые; имеющие обратимые повреждения; имеющие необратимые повреждения или разрушенные (рис. 2, а, б, в, г).

Интактные грамотрицательные бактерии визуализировались с чётким, непрерывным, трёхслойным контуром наружной и цитоплазматической мембран. Неповреждённые грамположительные бактерии имели одно- или многослойную гомогенную клеточную стенку, плотно прилегающую к трёхслойной непрерывной цитоплазматической мембране. Для грамотрицательных и

грамположительных бактерий в интактном состоянии характерно отсутствие выраженного периплазматического пространства. Цитоплазма интактных клеток бактерий имеет гомогенное мелкогранулярное строение средней электронной плотности с размером гранул в 15-30 нм, в соответствии с размерами рибосомальных структур. Нуклеоид характеризуется тонко-фибриллярным строением в виде компактной зоны меньшей электронной плотности относительно окружающей цитоплазмы и диффузным распределением по клетке небольшими электронно-светлыми зонами, либо центрально (рис. 2, а).

Обнаружены клетки бактерий, имеющие обратимые повреждения ультратонкой структуры (рис. 2, б), которые подразделились на три основные подгруппы:

а) с изменёнными размерами и формой, например, из-за сжатия при временном обезвоживании или набухания при временном нарушении барьеров проницаемости;

б) плазмолизированные, у которых основным нарушением является отхождение цитоплазмы от клеточной стенки вследствие повышения осмотичности среды, сопровождающееся частичным уплотнением цитоплазмы и изменением формы, но при полностью сохранённой целостности мембранного аппарата;

в) имеющие различные нарушения клеточной стенки в виде разрывов наружной мембраны и/или клеточной стенки для грамположительных бактерий, но сохранившие целостность цитоплазматической мембраны с ненарушенным строением цитоплазмы и нуклеоида.

Необратимые нарушения жизнедеятельности клеток неизбежно наступали при нарушении целостности цитоплазматической мембраны и деструктивных процессах в зоне нуклеоида или цитоплазмы. Соответственно, к группе бактерий с необратимыми повреждениями относятся клетки, имеющие:

а) разрыв всех слоёв клеточной стенки и цитоплазматической мембраны (рис. 2, в);

б) разрыв всех слоёв клеточной стенки, что обычно сопровождается вытеканием внутриклеточного содержимого (рис. 2, г);

в) частичную деструкцию цитоплазмы и нуклеоида (рис. 2, в, г);

г) полную деструкцию внутриклеточного содержимого, автолизированные клетки (рис. 2, д, е).

Обсуждение. Для изучения ультраструктуры микроорганизмов при трансмиссионной электронной микроскопии используется общепринятая методика приготовления препаратов ультратонких срезов бактерий, их фиксации и препарирования [6]. Несмотря на широкое использование этой методики, следует указать на ряд её недостатков. Методика включает многочисленные и длительные этапы фиксации и препарирования клеток, длительность её составляет от 5 до 10 суток (см. табл. 1). Из-за вымывания отдельных компонентов бактериальной клетки, цитоплазма и нуклеоид приобретают более разряженную и рыхлую структуру (см. рис. 1, а). Всё это отрицательно сказывается на сохранности внутренней структуры бактерий.

Для получения качественных препаратов ультратонких срезов бактериальных клеток выполнение основных этапов этой методики является обязательным. Попытки просто сократить сроки отдельных стадий процесса приготовления препаратов чаще всего заканчиваются ухудшением качества изображений. Неудачная подготовка биоматериала не позволяет проводить качественный ультраструктурный анализ, поэтому любые изменения

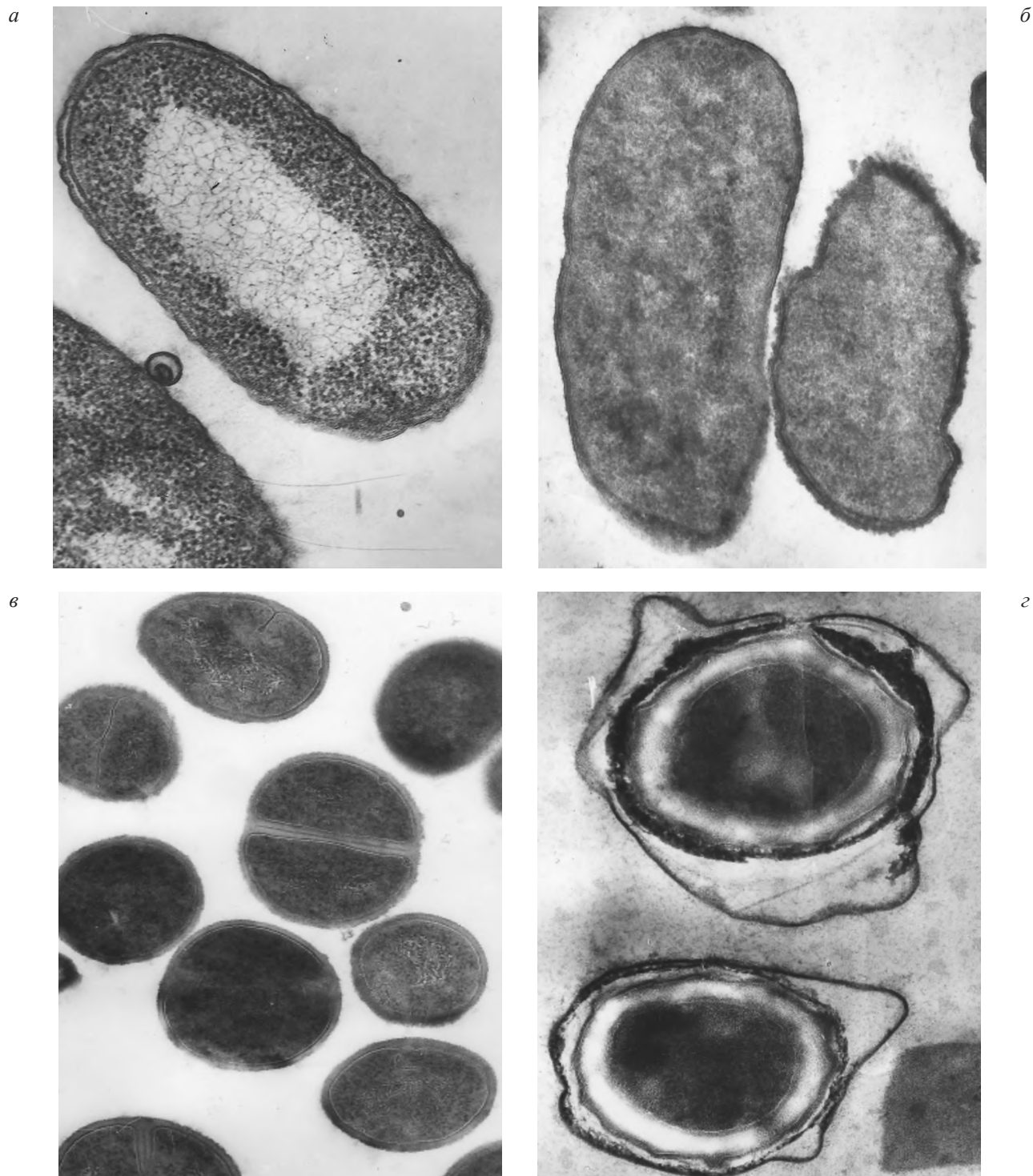


Рис. 1. Электронно-микроскопическое изображение ультратонких срезов бактерий и спор, полученных с помощью стандартной и ускоренной методики пробоподготовки.

а – *E. coli* K12 (стандартная методика, увеличение $\times 60000$), б – *E. coli* K12 (ускоренная методика, увеличение $\times 60000$), в – *S. aureus* 906 (ускоренная методика, увеличение $\times 30000$), г – *B. thuringiensis* 52 (ускоренная методика, увеличение $\times 65000$).

методики препарирования должны быть обоснованы и отлажены. Общепринятый способ приготовления ультратонких срезов, основанный на точных химических представлениях, складывался эмпирически и отработан во многих лабораториях. Разработка более простого и

быстрого способа получения препаратов ультратонких срезов бактерий остается актуальной.

Взяв за основу общепринятую «работающую» методику, мы получили более быстрый способ подготовки биологического материала. В основе разработанной ме-

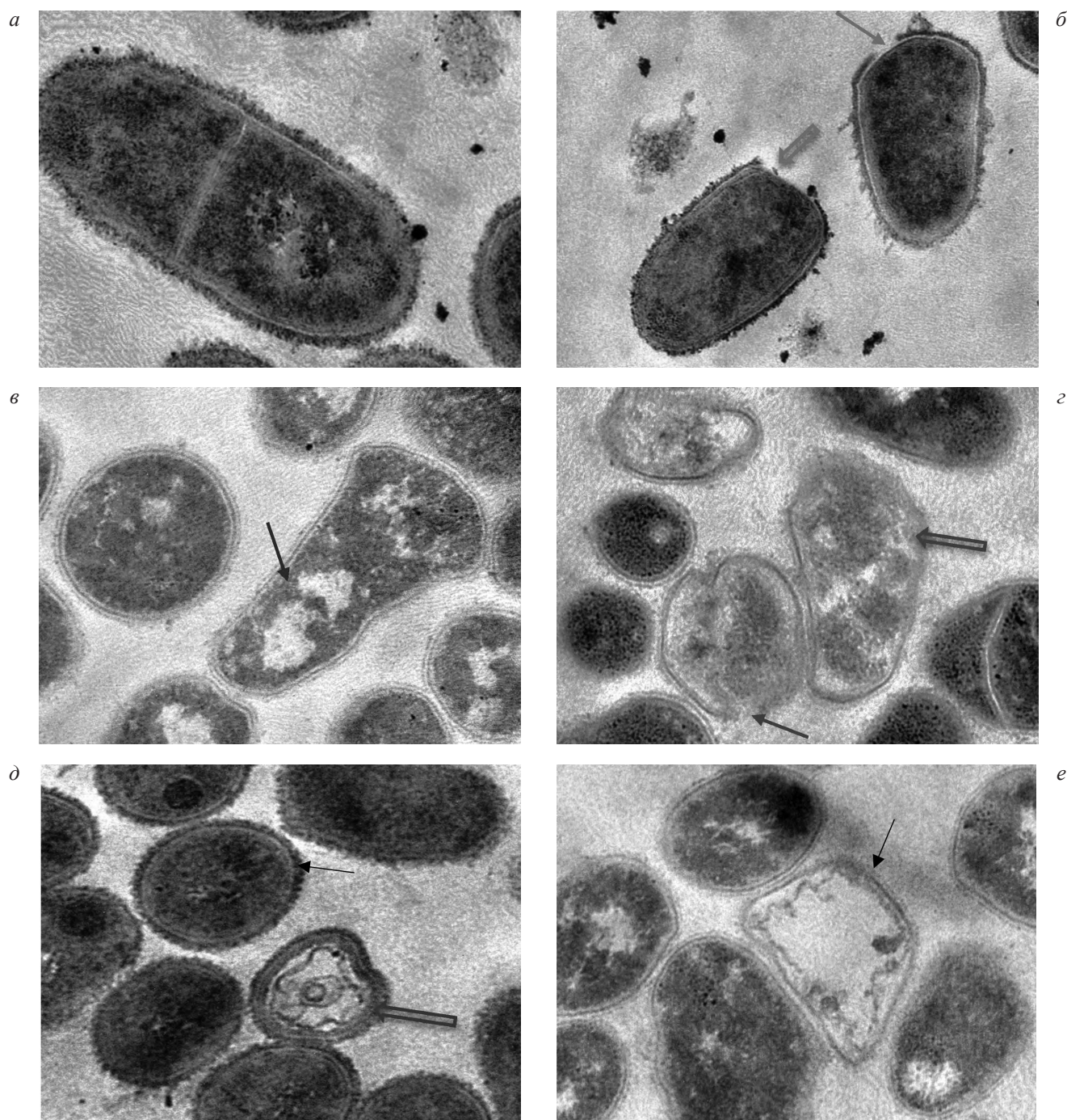


Рис. 2. Электронно-микроскопическое изображение ультраструктуры *C. diphtheriae gravis tox⁺ № 665* с обратимыми и необратимыми ультраструктурными нарушениями, полученные с помощью ускоренной методики пробоподготовки.

a – интактные бактериальные клетки (увеличение $\times 50000$), *б* – бактериальная клетка с разорванной клеточной стенкой (стрелка), клетка с разрывом клеточной стенки и цитоплазматической мембраны (двойная стрелка) (увеличение $\times 40000$), *в* – бактерии на начальных стадиях разрушения нуклеоида и цитоплазмы (стрелка) (увеличение $\times 32000$), *г* – бактерии с необратимыми структурными повреждениями: клетка с разрывом клеточной стенки и выходом клеточного содержимого (стрелка), клетка с разрушением внутриклеточного содержимого (двойная стрелка) (увеличение $\times 40000$), *д* – бактерии с интактной ультраструктурой (стрелка) и лизированным внутриклеточным содержимым (двойная стрелка), *е* – полностью лизированная клетка (стрелка) (увеличение $\times 35000$).

тодики ускоренной фиксации и препарирования клеток лежат те же базовые принципы подготовки материала: двойная химическая фиксация клеток, их дегидратация, пропитка и заливка в пластические среды. Если обычный процесс фиксации и подготовки занимает примерно

неделю, то с помощью предлагаемой методики он завершается за 1-2 дня с последующим получением достаточно качественных изображений. Суть излагаемой методики состоит в том, что с целью сокращения времени на подготовку бактерий к анализу, фиксацию и контра-

стирование клеток проводят одновременно, исключая этапы отмычки и заключения в агар, уменьшают время пропитки и полимеризации материала.

Наиболее важным этапом предлагаемой методики, потребовавшим максимальной отработки, является фиксация материала. Именно оптимальная фиксация позволяет как сохранить клетки в состоянии, близком к прижизненному, так и защищает их от повреждений, неизбежных при обезвоживании, заливке, резке на ультрамикротоме. Для фиксации использована смесь, состоящая из глутарового альдегида, уранилацетата и четырёхокси осмия. Уранилацетат используется, в основном, как краситель для повышения контраста изображения. Показано, что быстрая префиксация смесью глутаровый альдегид – уранилацетат позволяет получать достаточно качественные срезы [11]. Возможно, это связано с тем, что 0,5%-ный уранилацетат за несколько минут гелифицирует раствор ДНК, сохраняя ДНК-структуры, что всегда являлось проблемой препарирования. В собственных исследованиях мы неоднократно находили положительный результат краткой префиксации биоматериалов в глутаровом альдегиде и использовали это и при разработке предлагаемого метода. Существенно то, что при отсутствии отмычки на стадии постфиксации происходит смешивание фиксаторов. При смешивании эти вещества могут реагировать между собой с образо-

ванием компонентов и комплексов, обладающих дополнительным консервирующим и фиксирующим эффектом. Установлено, что фиксация бактерий в предлагаемой смеси позволяет лучше визуализировать структуру мембран и снизить до минимума экстракцию компонентов цитоплазмы, нуклеоида и нуклеоплазмы. На стадии импрегнации образцов смолами лучшие результаты получались при использовании пропиленоксида.

Предлагаемый метод экспрессной подготовки и визуализации ультраструктуры бактерий в трансмиссионном электронном микроскопе может быть использован для оценки не только качественных структурных повреждений клеток, но и количественных изменений микробной популяции.

Заключение. Разработанный метод экспрессной подготовки и визуализации ультраструктуры бактерий в трансмиссионном электронном микроскопе может успешно применяться для выявления структурных повреждений клеток и оценки качества микробной популяции. Использование этого метода позволяет более эффективно исследовать механизмы инактивации микроорганизмов на разных этапах контакта с АМП, дезинфектантами, биоцидами, включая различные стрессовые, повреждающие и летальные физические и химические воздействия. Методика ускоренной подготовки образцов бактерий для визуализации их тонкой структуры в элек-

Этапы препарирования бактерий по стандартной и ускоренной методике для визуализации ультраструктуры

Этап	Стандартный метод	Время	Ускоренный метод	Время
Фиксация и инактивация бактерий	Фиксация 2-4% раствором глутарового альдегида на На-какодилатном буфере (рН 7,2) или другом буфере	2-24 ч	Префиксация бактерий в смеси глутарового альдегида и уранилацетата	0,1 ч
Отмычка образцов от фиксатора	3-х кратная отмычка бактерий На-какодилатным буфером (рН 7,2) центрифугированием	0,5 ч	–	–
Контрастирование образцов	Контрастирование бактерий 0,5% раствором уранилацетата на На-какодилатном буфере (рН 7,2)	2-18 ч	–	–
Иммобилизация бактерий в инертную гелеобразную среду для исключения потерь клеток в процессе препарирования	Заключение бактерий в 1%-ный водный расплавленный раствор агара ($\geq 60^{\circ}\text{C}$)	0,25 ч	–	–
Дополнительная фиксация бактерий	Дофиксация бактерий в 1-2% растворе четырёх- окиси осмия на ацетат-вероналовом буфере (рН 6,0)	18-24 ч	Дофиксация образцов в фиксирующей смеси, полученной путём добавления к смеси глутарового альдегида и уранилацетата четырёхокси осмия	1,0 ч
Отмычка образцов от фиксатора	3-х кратная отмычка бактерий от осмия ацетат-вероналовым буфером (рН 6,0)	0,5 ч	–	–
Дегидратация образцов	Дегидратация образцов в растворах этилового спирта возрастающей концентрации	2,0 ч	Дегидратация образцов в растворах этилового спирта возрастающей концентрации	2,0 ч
Импрегнация образцов в смеси этилового спирта и эпоксидной смолы	Пропитывание образцов в смесях абсолютного этилового спирта и аралдита (эпона) в соотношениях (объём/объём) 3:1; 2:1; 1:1; 1:2; 1:3 по 2-18 ч в каждой	48-60 ч	Пропитывание образцов в смесях абсолютного этилового спирта и аралдита (эпона) в соотношениях (объём/объём) 3:1; 1:1; 1:3 при $+37^{\circ}\text{C}$ по 1,5 час. в каждой	4,5-5,0 ч
	Пропитка образцов чистой эпоксидной смолой при $+37^{\circ}\text{C}$	1,5-24 ч	Пропитка образцов чистой эпоксидной смолой при $+37^{\circ}\text{C}$ в вакууме (10^{-2-3} торр)	1,5-2,0 ч
Полимеризация образцов в эпоксидной смоле	Полимеризация образцов в чистой эпоксидной смоле при $+60^{\circ}\text{C}$	48 ч	–	–
	Полимеризация образцов в чистой эпоксидной смоле при $+90^{\circ}\text{C}$	24-48 ч	Полимеризация образцов в чистой эпоксидной смоле при $+90^{\circ}\text{C}$	14-27 ч
ИТОГО		150-228 ч		24-37 ч

тронном микроскопе может быть полезной при отладке различных биотехнологических процессов на стадиях культивирования микробов (концентрирования и обезвоживания биомассы, приготовление вакцин и др.).

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3-5, 11 см. REFERENCES)

1. Гренкова Т. А., Селькова Е. П., Гусарова М. П., Ершова О. Н., Александрова И. А., Сазыкина С. Ю. и др. Контроль за устойчивостью микроорганизмов к антибиотикам, антисептикам и дезинфицирующим средствам. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2014; 1 (74): 29-33.
2. Дятлов И.А., Детушева Е.В., Мицевич И.П., Детушев К.В., Подкопаев Я.В., Фурсова Н.К. Чувствительность и формирование устойчивости к антисептикам и дезинфектантам у возбудителей внутрибольничных инфекций. *Бактериология*. 2017; 2 (2): 48-58.
6. Герасимов В.Н., Дятлов И.А., Гайтрафимова А.Р., Киселева Н.В., Голов Е.А. Экспериментальный отбор перекисных композиционных дезинфектантов, обладающих спорцидным эффектом. *Дезинфекционное дело*. 2014; 2: 9-16.
7. Маринин Л.И., Дятлов И.А., Мокриевич А.Н., Шишкова Н.А., Тимофеев В.С., Миронова Р.И. и др. Методы изучения биологических и молекулярно-генетических свойств возбудителя сибирской язвы. М.: Издательство «Династия»; 2021.
8. Шахов А. Г., Сашнина Л.Ю., Владимиров Ю.Ю., Тараканов К.В., Карманова Н.В. Ультраструктурные изменения бактерий *Pasteurella multocida* под влиянием бактерицидных концентраций нитрофуранового препарата. *Ветеринарный фармакологический вестник*. 2018; 3: 6-10.
9. Керимли Э.Г., Гасымов Э.К., Серкерев С.В., Керимов Ю.Б., Рзаев Ф.Г., Мурадова С.А. и др. Изучение состава эфирного масла *Achillea nobilis L.* и его антибактериальное влияние на изменения ультраструктуры клеток *Staphylococcus aureus*. *Химия растительного сырья*. 2021; 1: 93-104.
11. Чеснокова М. Г., Чесноков В. А., Миронов А. Ю. Применение сканирующей электронной микроскопии с целью изучения биоплёнок *Candida albicans* на поверхности базисных пластмасс съёмных ортопедических конструкций. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64 (5): 308-13.
2. Dyatlov I.A., Detusheva E.V., Mitsevich I.P., Detushev K.V., Podkopaev Ya.V., Fursova N.K. Sensitivity and formation of resistance to antiseptics and disinfectants in causative agents of nosocomial infections. *Bakteriologiya*. 2017; 2 (2): 48-58. (in Russian)
3. Yamaguchi M., Chibana H. A Method for Obtaining Serial Ultrathin Sections of Microorganisms in Transmission Electron Microscopy. *J. Vis. Exp.* 2018; 131: 56235.
4. Hovnanyan K., Marutyan S., Pepoyan A., Navasardyan L., Trchounian A. Transmission and Scanning Electron Microscopy of Contacts between Bacterial and Yeast Cells in Biofilms on Different Surfaces. *Open Access Library Journal*. 2015; 2: e1492. Available at: <http://dx.doi.org/10.4236/oalib.1101492>. Open Element.
5. Nguyen H.T., O'Donovan L.A., Venter H., Russell C.C., McCluskey A., Page S.W. et al. Comparison of Two Transmission Electron Microscopy Methods to Visualize Drug-Induced Alterations of Gram-Negative Bacterial Morphology. *Antibiotics*. 2021; 10 (3): 307. Available at: <https://doi.org/10.3390/antibiotics10030307>. Open Element.
6. Gerasimov V.N., Dyatlov I.A., Gaitrafimova A.R., Kiseleva N.V., Golov E.A. Experimental selection of peroxide composite disinfectants with a sporicidal effect. *Dezinfeksionnoe delo*. 2014; 2: 9-16. (in Russian)
7. Marinin L.I., Dyatlov I.A., Mokrievich A.N., Shishkova N.A., Timofeev V.S., Mironova R.I. and other Methods of studying the biological and molecular-genetic properties of the causative agent of anthrax. Moscow: Dinastiya; 2021. (in Russian)
8. Shakhov A. G., Sashnina L.Yu., Vladimirova Yu.Yu., Tarakanov K.V., Karmanova N.V. Ultrastructural changes in *Pasteurella multocida* bacteria under the influence of bactericidal concentrations of the nitrofurane preparation. *Veterinarnyj farmakologicheskij vestnik*. 2018; 3: 6-10. (in Russian)
9. Kerimli E.G., Gasimov E.K., Serkerov S.V., Kerimov Yu.B., Rzaev F.G., Muradova S.A. et al. Study of the composition of *Achillea nobilis L.* essential oil and its antibacterial effect on changes in the ultrastructure of *Staphylococcus aureus* cells. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*. 2021; 1: 93-104. (in Russian)
10. Chesnokova M. G., Shalai V. V., Kraus Yu. A., Cherkashina N. V., Mironov A. Yu. Analysis of corrosion defects on oil pipeline surface using scanning electron microscopy and soil thionic and sulfate-reducing bacteria quantification. *Procedia engineering*. 2016; 152: 247-50.
11. Chesnokova M.G., Chesnokov V.A., Mironov A. Yu. Application of scanning electron microscopy to study *Candida albicans* biofilms on the surface of base plastics of removable orthopedic structures. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2019; 64 (5): 308-13. (in Russian)