



УДК 616.934: 578.233: 53.086

## СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИЗУЧЕНИЯ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ ПОВЕРХНОСТИ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ МИКРООРГАНИЗМОВ В УСЛОВИЯХ НЕБЛАГОПРИЯТНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ФАКТОРОВ БИОТИЧЕСКОЙ И АБИОТИЧЕСКОЙ ПРИРОДЫ МЕТОДАМИ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ



П. С. Ерохин, Д. В. Уткин, Н. А. Осина, А. В. Бойко,  
О. С. Кузнецов, В. Е. Куклев, Т. В. Бугоркова

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов  
E-mail: rusrap1@microbe.ru

В статье приведены основные сведения о применении атомно-силовой микроскопии для изучения влияния факторов биотической и абиотической природы на ультраструктуру и морфологические особенности микроорганизмов.

**Ключевые слова:** микроорганизмы, атомно-силовая микроскопия, шероховатость, сила адгезии, биотические факторы, абиотические факторы.

**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**

P. S. Erokhin, D. V. Utkin, N. A. Osina, A. V. Boyko,  
O. S. Kuznetsov, V. E. Kuklev, T. V. Bugorkova

This article presents data about current application of atomic force microscopy for study the influence factors biotic and abiotic nature on ultrastructure and morphological features of microorganisms.

**Key words:** microorganisms, atomic force microscopy, roughness, biotic factors, abiotic factors.

DOI: 10.18500/1816-9775-2016-16-2-186-189

В микробиологии световая микроскопия является бесспорным лидером среди всех методов визуализации в силу доступности, относительной простоты приготовления исследуемых образцов, а также возможности изучения биологических структур в близких к природным условиям. Слабой стороной оптических приборов является ограниченная дифракционным пределом разрешающая способность. Именно поэтому ультраструктуру микроорганизмов удалось изучить и описать лишь с появлением электронной микроскопии в 40-е гг. XX в. Однако электронная микроскопия, до настоящего времени являющаяся единственным методом визуализации нанометрового разрешения, имеет ряд недостатков, главные из которых – сложность приготовления препаратов и необходимость проведения исследований в условиях высокого вакуума.

В 1981 г. Гердом Биннигом и Генрихом Рорером был изобретен сканирующий зондовый микроскоп (Нобелевская премия 1986 г.), в основе работы которого лежит регистрация взаимодействия, возникающего между зондом и поверхностью образца при сканировании. В настоящее время существует целое семейство зондовых микроскопов, один из которых – атомно-силовой микроскоп (АСМ) – наиболее активно используется для изучения биологических образцов микронного и субмикронного уровня организации благодаря простой процедуре пробоподготовки и возможности визуализации объектов практически в любой биологической среде.

Существование бактерий во многом зависит от влияния различных условий среды обитания. При воздействии неблагоприятных факторов окружающей среды реализуются адаптационные свойства микроба, которые могут проявляться в обратимых или необратимых изменениях поверхностных структур клетки [1]. Они могут быть зарегистрированы с использованием ряда методов микроскопической техники, в том числе атомно-силовой микроскопии (АСМ) [2]. АСМ позволяет оценить морфологические и механические параметры бактерий, изменяющиеся под влиянием биотических и абиотических факторов.

Так, под действием катионных антимикробных пептидов, например магаинина 2, отмечено изменение упруго-механических свойств *Escherichia coli*: снижение значений модуля Юнга на 25,89 % [3]. Для клеток *Bacillus cereus* снижение этого показателя составило 41,44 % [3]. Действие антибиотика ампициллина на клетки *B. cereus* вызывало несколько типов изменений у микробной клетки, которые стало возможно оценить с помощью АСМ не только качественно, но и количественно. При сравнении с контрольными показателями часть бактериальных клеток изменила свои линейные размеры в сторону снижения длины в 1,2–1,7 раза, увеличения ширины в 1,8–2,0 раза, некоторые клетки при-



няли сферическую форму. Другой показатель поверхности клеточной стенки – шероховатость (**Rq**) возрос до  $11,37 \pm 3,54$  нм, что в 4–5 раз превышает контрольные значения [3]. Аналогичные результаты были получены с помощью АСМ и другими исследователями [4, 5]. Например, при изучении влияния ванкомицина и оритаванцина на *Helicobacter pylori* отмечено резкое снижение линейных размеров клеток и увеличение шероховатости их поверхности [4].

При использовании полуконтактного метода, а также методов рассогласования и отображения фазы в реальном времени была изучена морфология клеточной стенки бактерий, обработанных катионным антимикробным пептидом (КАМП) или пептидом СМ15 [2, 6]. Установлено, что в клетке происходит формирование пор диаметром от 2 до 4 нм, а также увеличивается средняя квадратичная шероховатость их поверхности. При этом действие препаратов на грамположительные бактерии проявлялось в меньшей степени, чем на грамотрицательные [2, 6].

С помощью полуконтактного метода и метода постоянной высоты АСМ рядом исследователей выявлена зависимость степени разрушения клеток *E. coli* от концентрации и времени воздействия антибиотика на патогенные микроорганизмы [7, 8]. Ранее нами с помощью бесконтактного режима АСМ (в жидкости) показано, что при воздействии неомицина В сульфата и гентамицина на штаммы *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* наблюдалось снижение высоты (толщины) бактерий на 50% через 33 мин экспозиции [8]. Кроме того, для каждого вида бактерий минимальная концентрация антибактериального препарата, оказывающего влияние на клетку, была различной. Были установлены минимальные концентрации антибиотика, влияющие на микробную клетку для каждого вида бактерий [8].

Под воздействием антибиотиков происходили изменения не только толщины бактерий, но и индекса I (соотношение ширины бактерий к их высоте), которые указывают на запуск защитных механизмов бактериальной клеткой, а также увеличение шероховатости поверхности клетки и силы адгезии. При этом изменение последних показателей зависело от степени воздействия антибактериальных препаратов. Максимальное воздействие оказывал антибактериальный препарат в концентрациях от 20 до 40 мкг/мл.

Под воздействием муцина в различных физиологических условиях – на воздухе, в воде и среде культивирования наблюдаются изменения линейных размеров *E. coli* и *Proteus mirabilis* R45

[9], например, длины, ширины. Более того, с применением методов постоянной высоты АСМ и туннельной микроскопии была установлена динамика изменений длины, ширины и высоты в зависимости от физиологических условий – на воздухе, в воде и среде культивирования.

Метод модуляции силы также был успешно использован для изучения адгезионного взаимодействия химиотерапевтических веществ с поверхностью различных материалов, а также для изучения лекарственного и других воздействий факторов внешней среды на микроорганизмы [10, 11] – антибактериальных препаратов и интерферонов.

В настоящее время накоплен достаточно большой опыт использования атомно-силовой микроскопии для оценки воздействия на бактериальную клетку неорганических и органических веществ, биологически активных соединений, а также вирусных частиц (на примере бактериофагов).

С использованием метода рассогласования АСМ [12] было изучено взаимодействия холерных бактериофагов со штаммами *V. cholerae*. Установлено, что через 30 мин инкубации диагностических бактериофагов с вибрионами происходят заметные изменения клеточной стенки с максимальной адсорбцией фаговых частиц на поверхности клеток и началом выхода фагов наружу. Через 60 мин наблюдается разрушение клеток бактерий [12].

Изменение pH среды обитания микроорганизмов может вызывать различные реакции. Так, бактерии *Shigella sonnei* ATCC25931, находящиеся в кислой среде (pH 3,5) в течение 60 мин, формируют защитный слой [13].

На адгезию клеток к поверхностям оказывают влияние условия роста микроорганизма. С помощью методов АСМ различными авторами показано, что при кислых значениях pH среды микроорганизмы более активно прикрепляются к поверхности субстрата [13, 14].

При определении адгезии клеток *Azospirillum brasilense* к подложке в условиях роста в течение 2 ч при температуре 30 °C и в течение 24 ч при 40 °C методом модуляции силы,  $F_{adh}$  составила  $0,8 \pm 0,2$  и  $0,2 \pm 0,02$  нН соответственно [15].

При воздействии веществ, оказывающих влияние на адгезию грамположительных и грамотрицательных (*E. coli*, *S. aureus*) бактерий, например клюквенного сока, выявлено существенное снижение показателя силы адгезии для *E. coli*, но не для *S. aureus* [16].

В последние годы пристальное внимание уделяется вопросам взаимодействия углеродных



наноматериалов с биологическими объектами [17], в частности с микроорганизмами.

Рядом авторов на модели грамположительных и грамотрицательных бактерий показано влияние различных веществ (хитозана, наночастиц ZnO, фуллеренов C60) на клеточную поверхность, вызывающих ее изменения [18–21]. Установлено, что при воздействии хитозана с молекулярной массой 628 кДа происходит снижение линейных размеров модельных микроорганизмов в 1,8–2,3 раза [19]. При исследовании влияния фуллеренов на микробную клетку отмечено увеличение проводимости клеточной стенки до 32,3% в зависимости от концентрации частиц [21].

Особый интерес представляют данные, полученные при изучении процесса прорастания спор в благоприятных условиях (при наличии воды и питательных веществ). Размер спор был определен ранее –  $1,2-1,27 \times 0,74-0,8$  мкм [15, 22]. Авторы в своей работе показали, что в процессе герминации спор их размер увеличивается с 0,8–0,9 мкм до 3,4–3,8 мкм за 3 ч [22, 23]. Кроме того, меняется архитектура поверхности клетки: изменяются борозды на поверхности спор в процессе их прорастания [22, 24].

На модели *E.coli*, *Bacillus subtilis* с помощью атомно-силовой микроскопии показано воздействие 2,5% глутаральдегида, 10% формалина, 4% параформальдегида, а также смеси метанол/ацетон в соотношении 1:1 и этанол/уксусная кислота в соотношении 3:1. Установлено, что из всех вариантов химического воздействия на микробную клетку только 2,5% глутаральдегид полностью сохраняет ультраструктуру микробной клетки и может быть использован в качестве фиксатора [25, 26]. Эффективность использования глутарового альдегида для фиксации была также показана рядом исследователей.

Проведенные нами исследования показали, что под влиянием биогенного амина серотонина на клетки *F.tularensis* 15НИИЭГ в них наблюдается увеличение толщины слоя капсулоподобного вещества в 5,8 раза по сравнению с контролем: 196,5 и 33,4 нм соответственно [27].

Такие изменения в клетке туляремийного микроба могут быть связаны с одним из механизмов повышения устойчивости возбудителей инфекционных болезней к стрессовым факторам, что связано с продукцией на поверхности клеток дополнительного экзополисахаридного слоя (ЭПС) [28].

Методами контактной АСМ изучены упругие свойства бактерий, входящих в состав био-

пленки в условиях неблагоприятного действия NaCl на *E.coli*, *B.subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas putida*. Установлено, что сила жесткости варьировала в диапазоне от  $0,16 \pm 0,1$  Н/м до  $0,41 \pm 0,1$  Н/м [29].

Ранее нами было показано, что максимальное увеличение индекса I, отражающего защиту бактериальной клетки от воздействия неблагоприятного фактора, в 1,75 раза наблюдается под воздействием 3М гипертонического раствора хлорида натрия в течение 120 мин [30]. Такая же зависимость наблюдалась для показателей шероховатости и силы адгезии: увеличение по сравнению с нормой в 1,8 и 1,5 раза соответственно.

Таким образом, представленные выше сведения отечественных и зарубежных исследователей, а также данные, полученные нами ранее, показывают, что под воздействием биотических и абиотических факторов происходят изменения ряда параметров ультраструктуры поверхности бактериальных клеток: шероховатости, индекса I, силы адгезии, силы жесткости, а также морфометрических показателей: толщины, высоты, длины. Качественная и количественная оценка данных показателей может быть успешно выполнена с использованием разнообразных методов АСМ.

Благодаря своим возможностям данный тип микроскопической техники может быть использован для комплексной оценки состояния бактериальных клеток в различных условиях существования и при разнообразных воздействиях, в том числе антибактериальных и антисептических препаратов, при тестировании новых химических соединений в качестве дезинфицирующих средств, изучении специфического лизиса бактерий бактериофагами, осмотическом стрессе и других воздействиях.

## Список литературы

1. Rhen M., Eriksson S., Pettersson S. Microbial manipulation of innate immunity responses // Curr. Opin. in Microbiol. 2000. Vol. 3. P. 60–64.
2. Васильченко А. С. Исследование морфо-функциональной реакции бактерий на различные воздействия с использованием атомно-силовой микроскопии : автореф. дис. ... канд. биол. наук. Пермь, 2012. 22 с.
3. Nikiyan H., Vasilchenko A., Deryabin D. AFM investigations of various disturbing factors on bacterial cells // Formatex. 2010. P. 523–529.
4. Domenech O., Francius G., Tulkens P. M., Bambecke F. V., Durfene Y., Mingeot-Leclercq M.-P. Interactions of oritavancin, a new lipoglycopeptide derived from vancomycin, with phospholipid bilayers : effect on membrane permeability and nanoscale lipid membrane organization // Biochim. et Biophys. Acta. 2009. Vol. 1788. P. 1832–1840.



5. Couture-Tosi E., Ranck J.-L., Haustant G., Pehau-Arnaudet G., Sachse M. Cemovis on a pathogen : analysis of *Bacillus anthracis* spore // Biol. Cell. 2010. Vol. 102. P. 609–619.
6. Ouberai M., Garch F. E., Bussiere A., Riou M., Alstevens D., Lins L., Baussanne I., Dufrene Y. F., Brasseur R., Decout J.-L., Mingeot-Leclercq M.-P. The *Pseudomonas aeruginosa* membranes: a target for a new amphiphilic aminoglycoside derivative? // Biochim. et Biophys. Acta. 2011. Vol. 1808. P. 1716–1727.
7. Braga P. C., Ricci D. Atomic force microscopy : application to investigation of *Escherichia coli* morphology before and after exposure to cefodizime // Antimicrob. Agents and Chemother. 1998. Vol. 42, № 1. P. 18–22.
8. Ерохин П. С., Уткин Д. В., Кузнецов О. С., Коннов Н. П., Осина Н. А. Применение атомно-силовой микроскопии для определения воздействия антибактериальных препаратов на микробную клетку (на примере *E.coli* и цефалоспоринов I поколения) // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Физика. 2013. Т. 13, вып. 2. С. 28–33.
9. Hammer M. U., Brauser A., Olak C., Bresesinski G., Goldmann T., Gustmann T., Andra J. Lipopolysaccharide interaction is decisive for the activity on the antimicrobial peptide NK-2 against *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* // Biochem. J. 2010. Vol. 427. P. 477–488.
10. Narayan G. P., Kartik V., Manoj P., Singh P. S., Alka G. Antibacterial activities of ethanolic extracts of plants used in folk medicine // IJRAP. 2010. Vol. 1, № 2. P. 529–535.
11. Schwarzenbach M. S., Reimann P., Thommen V., Hergen M., Mumenthaler M., Guntherodt H.-J. Interferon  $\alpha$ -2a interactions on glass vial surfaces measured by atomic force microscopy // J. of Pharm. Sci. and Technol. 2002. Vol. 56, № 2. P. 78–89.
12. Уткин Д. В., Ерохин П. С., Осина Н. А., Коннов Н. П. Оценка фаголизательности штаммов холерных вибрионов с использованием атомно-силовой микроскопии // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2013. Т. 13, вып. 3. С. 81–84.
13. Ellafi A., Harbi B., Lagha R., Bakhrouf A. The combined effects of starvation and pH on the virulence of *Shigella sonnei* ATCC25931 // Afr. J. of Biotechnol. 2013. Vol. 12, iss. 16. P. 2034–2040.
14. Teixeira P., Lima J., Azeredo J., Oliveira R. Adhesion of *Listeria monocytogenes* to materials commonly found in domestic kitchens // Intern. J. of Food Sci. and Technol. 2008. Vol. 43. P. 1239–1244.
15. Gaboriaud F., Dufrene Y. F. Atomic force microscopy of microbial cells: application to nanomechanical properties, surface forces and molecular recognition forces // Coll. and Surf. B : Bioint. 2006. Vol. 54. P. 1–10.
16. Abu-Lail L., Tao Y., Pinzon-Arango P. A., Howell A., Camesano T. A. Using atomic force microscopy to measure anti-adhesion effects on uropathogenic bacteria, observed in urine after cranberry juice consumption // J. of Biomat. and Nanobiotech. 2012. Vol. 3. P. 533–540.
17. Нукиян А. Н., Татлыбаева Е. Б. Успехи и перспективы развития атомно-силовой микроскопии в микробиологии // Вестн. ОГУ. 2014. № 6, вып. 167. С. 112–119.
18. Wang C., Liu L.-L., Zhang A.-T., Xie P., Lu J.-J., Zou X.-T. Antibacterial effects of zinc oxide nanoparticles on *Escherichia coli* K88 // Afr. J. of Biotechnol. 2012. Vol. 11, № 44. P. 10248–10254.
19. Fernandes J. C., Eaton P., Gomes A. M., Pintado M. E., Malcata F. X. Study of the antibacterial effects of chitosans on *Bacillus cereus* (and it's spores) by atomic force microscopy imaging and nanoindentation // Ultramicrosc. 2009. Vol. 109. P. 854–860.
20. Дерябин Д. Г., Васильченко А. С., Алешина Е. С., Глязлова А. С., Нукиян А. Н. Исследование взаимодействия углеродных наноматериалов с клетками *Escherichia coli* методом атомно-силовой микроскопии // Рос. нанотех. 2010. Т. 5, № 11–12. С. 136–141.
21. Fang J., Lyon D. Y., Wiesner M. R., Dong J. P., Alvarez P. J. J. Effect of a fullerene water suspension on bacterial phospholipids and membrane behavior // Environ. Sci. Technol. 2007. Vol. 41. P. 2636–2642.
22. Chada V. G. R., Sanstad E. A., Wang R., Driks A. Morphogenesis of *Bacillus* spore surfaces // J. of Bacteriol. 2003. Vol. 185, № 21. P. 6255–6261.
23. Ильина Т. С., Романова Ю. М., Гинцбург А. Л. Биопленки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина : феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития // Генетика. 2004. № 40. С. 1–12.
24. Zaman M. S., Goyal A., Dubey G. P., Gupta P. K., Chandra H., Das T., Ganguli M., Singh Y. Imaging and analysis of *Bacillus anthracis* spore germination // Microsc. Res. Tech. 2005. Vol. 66, № 6. P. 307–311.
25. 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. P. 381–392.
26. Кухтевич И. В., Жуков М. В., Чубинский-Надеждин В. И. Фиксация бактерий *E. coli* на подложке для измерений в жидкости методом атомно-силовой микроскопии // Науч. приборостроение. 2012. Т. 22, № 4. С. 56–61.
27. Ключева С. Н., Шуковская Т. Н., Ерохин П. С., Уткин Д. В. Оценка влияния биогенного амина серотонина на морфологию туляремийного микроба методом атомно-силовой микроскопии // Материалы XVIII Российского симпозиума по растровой электронной микроскопии и аналитическим методам исследования твердых тел. МО, Черноголовка, 2013. С. 470–471.
28. Wai S. N., Mizunoe Y. A., Kawabata T. S., Yoshida S. *Vibrio cholerae* O1 strain TSI-4 produces the exopolysaccharide materials that determine colony morphology, stress resistance, and biofilm formation // Appl. Environ. Microbiol. 1998. Vol. 64. P. 3648–3655.
29. Volle C. B., Ferguson M. A., Aidala K. E., Spain E. M., Nunes M. E. Spring constants and adhesive properties of native bacterial biofilm cells measured by atomic force microscopy // Coll. and Surf. B : Bioint. 2008. Vol. 67, iss. 1. P. 32–40.
30. Ерохин П. С., Заднова С. П., Крепостнова И. М., Коннов Н. П., Уткин Д. В., Кузнецов О. С. Изучение динамических характеристик поверхностной структуры типичных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эльтор и их геновариантов методом атомно-силовой микроскопии // Материалы Рос. конф. по электрон. микроскопии – XXV. МО, Черноголовка, 2014. Т. 2. С. 580–581.