

УДК 576.3.314: 579.23.234

ИССЛЕДОВАНИЕ ТОПОГРАФИИ ПОВЕРХНОСТИ *BACILLUS SUBTILIS* В УСЛОВИЯХ ГИПОТЕРМИИ

Артамонова М.Н., Потатуркина-Нестерова Н.И.

ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», Ульяновск,
e-mail: artamonovamn2013@yandex.ru

С помощью атомно-силовой микроскопии изучена морфология поверхности бактериальных клеток *Bacillus subtilis*, подвергавшихся холодовому шоку при температурах +5, 0 и –5°C. Оценка структурированности поверхности бацилл производилась по четырем показателям: Sz (среднее абсолютное значение пяти наивысших пиков и пяти самых глубоких впадин), Sa (средняя арифметическая шероховатость), Sq (среднеквадратичная шероховатость поверхности), Sy (максимальный перепад высот между самой верхней и нижней точками поверхности профиля). В ходе исследования установлено, что снижение температуры культивирования до +5°C приводило к уменьшению шероховатости бактериальной поверхности по всем исследуемым параметрам. У бацилл, подвергшихся холодовому воздействию при температурных показателях 0°C и –5°C, наблюдалось увеличение шероховатости бактериальной поверхности по сравнению с бациллами контрольной группы. Стрессовое воздействие низкими температурами вызвало увеличение показателя структурированности микробной поверхности за счет увеличения количества складок (показатель Sz) и их высоты (показатель Sy).

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, поверхность бактерий, шероховатость поверхности

RESEARCH OF *BACILLUS SUBTILIS* SURFACE TOPOGRAPHY IN HYPOTHERMIA

Artamonova M.N., Potaturkina-Nesterova N.I.

Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, e-mail: artamonovamn2013@yandex.ru

It has been studied the surface morphology of bacterial cells *Bacillus subtilis*, whose exposed cold shock at temperatures of 5, 0 and –5°C with atomic force microscopy. Evaluation of bacillus structure surface was performed on four indicators: Sz (average absolute value of the five highest peaks and the five the deepest depressions), Sa (arithmetic average roughness), Sq (the mean square roughness), Sy (the maximum height difference between the very top and bottom points of the surface profile). It has been established that the reduction of cultivation temperature to 5°C led to a decrease in bacterial surface roughness for all investigated parameters. It has been shown increase of bacillus bacterial surface roughness in comparison with the control group at 0 and –5°C. Increase in the structuring of microbial surface with increasing the number folds (figure Sz) and their height (a measure of Sy) caused by stress effects of low temperature.

Keywords: atomic force microscopy, bacterial surface, surface roughness

В естественной среде микроорганизмы постоянно подвергаются воздействию разного рода стрессов. Одним из факторов, вызывающих стресс, является низкая температура. У бактерий в процессе воздействия на них стрессовых факторов и формирования адекватного ответа роль первичных сенсоров выполняют мембранные структуры. Известно, что первичным сигналом при восприятии температурного стресса бактериями является изменение структуры их биологической мембраны. Развитие микроорганизмов в условиях гипотермии приводит к снижению текучести мембраны и ее уплотнению, что в свою очередь отражается на таких физических характеристиках бактериальной поверхности, как шероховатость и структурированность. Шероховатость поверхности микробных клеток представляет собой совокупность неровностей, образующих микро-рельеф поверхности и является причиной того, что истинная площадь поверхности бактерий выше, чем геометрическая. Коли-

чественная оценка шероховатости поверхности мембран имеет важное практическое значение, так как позволяет выявить влияние гомогенности или гетерогенности поверхности на устойчивость к гипоосмотическим нагрузкам [1, 4, 5].

Исследование влияния гипотермии на бактерии освещалось в основном в физиологическом аспекте и касалось механизмов адаптации микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды [6, 7, 8]. Однако работ, связанных с исследованием поверхности микробных клеток в условиях низких температур, нет.

В связи с этим целью исследования явилось изучение топографии поверхности *Bacillus subtilis* в условиях гипотермии.

Материалы и методы исследования

В работе было использовано 54 штамма *Bacillus subtilis*, которые были выделены из ризосферы *Cucurbita pepo* L. Изоляты культивировали в жидкой питательной среде LB (Россия) при 37°C.

По истечении 24 часов, что соответствовало экспоненциальной фазе роста, бактерии подвергались холодному шоку в течение 24 часов в диапазоне температур $+5^{\circ}\text{C}$ (1 группа), 0°C (2 группа), -5°C (3 группа). В качестве контрольной группы были отобраны бактерии суточной культуры, не подвергавшиеся холодному шоку. Из каждой группы бактерий отбиралась суспензия бактериальных клеток для приготовления образцов. Бактериальную суспензию осаждали центрифугированием (3000 об/мин, 10 мин) и стандартизировали до оптической плотности 0,3 ед., что соответствовало $1,5 \times 10^8$ количества колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл. Затем по 1,0 мкл каждой из суспензий наносили на подложку, в качестве которой использовали покровные стекла размером 5×5 мм.

Изучение топографии поверхности бактерий осуществляли с использованием сканирующего зондового микроскопа Solver P47-PRO (NT-MDT, Россия). Сканирование образцов производили в полуконтактном режиме на площади 25×25 мкм, используя зонды с золотым напылением серии NSG10 (NT-MDT, Россия) размером 95×30 мкм, с жесткостью балки 17 Н/м, радиусом закругления иглы 10 нм. Анализ полученных изображений и расчёт показателей шероховатости производили с помощью программного обеспечения микроскопа Nova и ФемтоСкан Онлайн.

Для характеристики структуры поверхности бактерий применялись феноменологические характеристики, которые определены в терминах микрогеометрии и классической статистики. При АСМ измерениях регистрировали кадры различного размера с разных участков поверхности, что позволяло проводить усреднение параметров микрорельефа на пространственном масштабе 5×5 мкм. По каждому кадру рассчитывали значения шероховатости Sz , среднеарифметическую шероховатость Sa , среднеквадратичную шероховатость Sq и максимальный перепад высот $Smax$. Данные параметры определяли наиболее общие свойства, отражающие состояние рельефа всех видов поверхности:

1. Sz – шероховатость поверхности по выбранному пяти максимальным высотам и впадинам (среднее абсолютное значение пяти наивысших пиков и пяти самых глубоких впадин), нм:

$$Sz = \frac{1}{5} (\sum Y_{pi} + \sum Y_{vi}),$$

где Y_{pi} – высота i -го наибольшего выступа профиля; Y_{vi} – глубина i -й наибольшей впадины профиля. Параметр Sz использовали для общей оценки степени «пересеченности рельефа поверхности» (рис. 1).

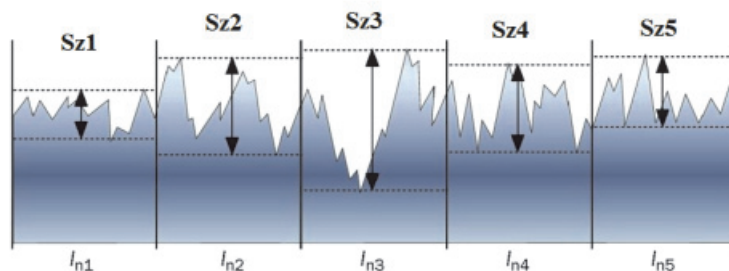


Рис. 1. Схематическое изображение высоты неровностей профиля по пяти выбранным точкам

2. Sa – средняя арифметическая шероховатость

$$Sa = \left(\frac{1}{N^2} \right) \sum |Z(i, j) - Z_{mean}|,$$

где $Z_{mean} = \frac{1}{N^2} \sum Z(i, j)$. Данный параметр характеризует среднее арифметическое отклонение значений пиков и впадин на профиле от средней линии (рис. 2). При помощи Sa можно определить, являются откло-

нения вершинами или впадинами. Чем меньше значение Sa , тем ровнее поверхность.

3. Sq – среднеквадратичная шероховатость поверхности:

$$Sq = \left\{ \left(\frac{1}{N^2} \right) \sum (Z(i, j) - Z_{mean})^2 \right\}.$$

Она определяла дисперсию случайной величины и характеризовала рассеяние отдельных ее значений от центра распределения.

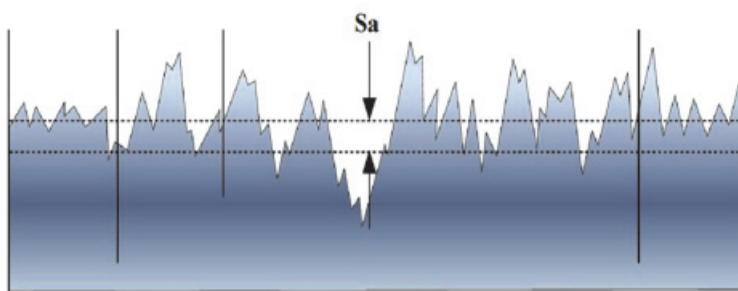


Рис. 2. Схематическое изображение среднего арифметического отклонения анализируемого профиля

4. S_y – максимальный перепад высот между самой верхней и нижней точками поверхности профиля (рис. 3). Этот параметр соответствует толщине поверхностного слоя, заключенного между плоскостями, проходящими через самую низкую и самую высокую

точки поверхности. Ниже этого слоя лежит сплошной материал. Таким образом, S_z можно рассматривать как параметр, характеризующий толщину поверхностного, возмущенного слоя, не полностью заполненного материалом, в котором происходит изменение рельефа.

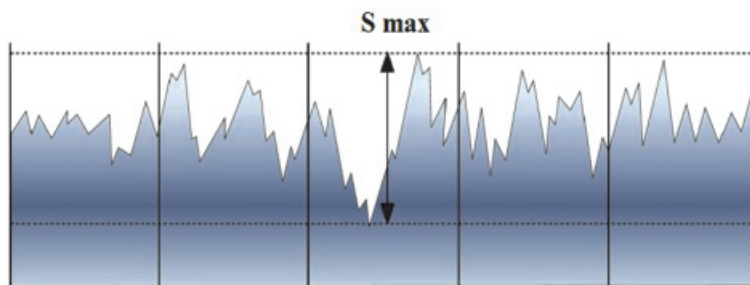


Рис. 3. Схематическое изображение наибольшей высоты профиля

По перечисленным параметрам оценивали степень различия между поверхностями бактериальных клеток при различных значениях температурного фактора.

Визуализацию бактериальных клеток производили минимум на 50 клетках *B. subtilis* из каждого образца. Статистическую обработку данных осуществляли с использованием программ «Microsoft Excel» и «Statistika 6.0». Оценку статистической значимости полученных результатов осуществляли с помощью t-критерия Фишера – Стьюдента ($p < 0,05$).

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты исследования, полученные с помощью атомно-силовой микроскопии, представляли собой геометрические образы в виде двумерных и трехмерных изображений поверхности. На АСМ-изображениях проводили продольные и поперечные сечения, вдоль которых строили профиль поверхности (рис. 4). Обработка полученных

микропрофилей заключалась в анализе стандартных среднестатистических параметров поверхности: S_y , S_z , S_a , S_q .

Приведенные в таблице параметры S_y , S_z , S_a , S_q , называемые амплитудными или высотными параметрами, служили для характеристики нерегулярности поверхности в вертикальном направлении.

Оценка показателя S_y , выражающего максимальную высоту между самой верхней и нижней точками профиля, показала, что холодовой шок вызвал достоверное снижение данного показателя у бактерий при значении температурного фактора $+5^\circ\text{C}$ по сравнению с бациллами контрольной группы, у которых данный показатель составил 185,6 нм. Культивирование бактерий в условиях гипотермии при температуре 0 и -5°C привело к незначительному увеличению максимального размаха высот.

Показатели шероховатости поверхности *Bacillus subtilis* при различных температурных показателях

	S_y , нм	S_z , нм	S_a , нм	S_q , нм
Контрольная группа	185,6	663,4	30,4	38,8
$+5^\circ\text{C}$	123,2	770,8	24,4	30,1
0°C	206,5	795,4	36,6	47,1
-5°C	227,3	874,6	43,6	53,1

Гипотермия вызвала колебание показателя S_z , характеризующего шероховатость по пяти высшим точкам и впадинам. У бактерий, подвергшихся холодовому шоку при $+5$ и 0°C , происходило достоверное увеличение данного показателя в 1,2 и 1,4 раза соответственно. Культивирование при -5°C не вызвало дальнейшего увеличения данного показателя, характеризующего общую исчерченность рельефа поверхности микробных клеток.

Более детальной характеристикой структурированности поверхности является показатель средней арифметической шероховатости. В условиях гипотермии при $+5^\circ\text{C}$ бактерии характеризовались более гладкой поверхностью по сравнению с бациллами контрольной группы. Холодовой шок, вызванный снижением температуры до 0 и -5°C , обусловил достоверное увеличение показателя средней арифметической шероховатости до 36,6 и 43,6 нм соответственно (рис. 5).

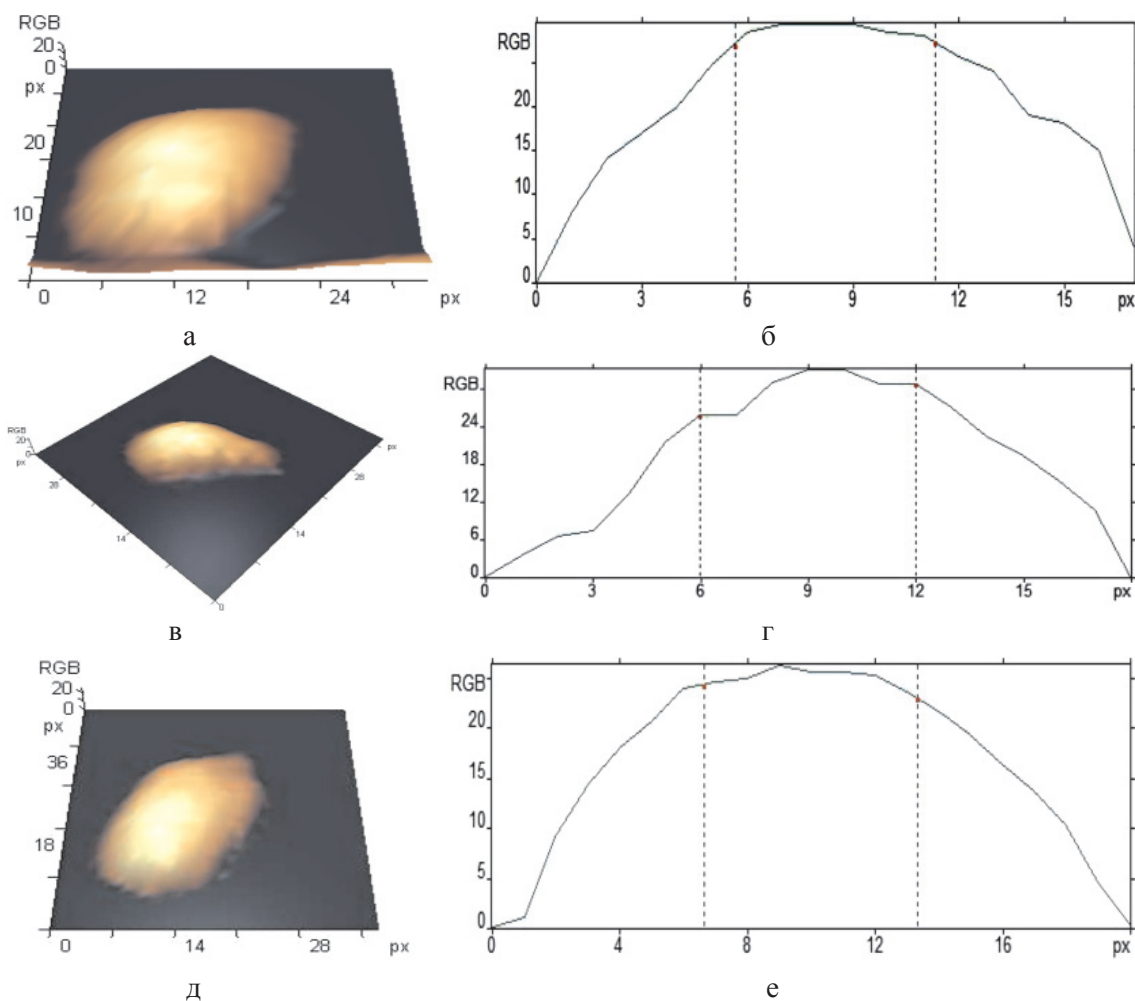


Рис. 4. ACM-изображение *Bacillus subtilis* в условиях гипотермии (3D и профиль сечения): а, б – при температуре -5°C ; в, г – при температуре 0°C ; д, е – при температуре $+5^{\circ}\text{C}$

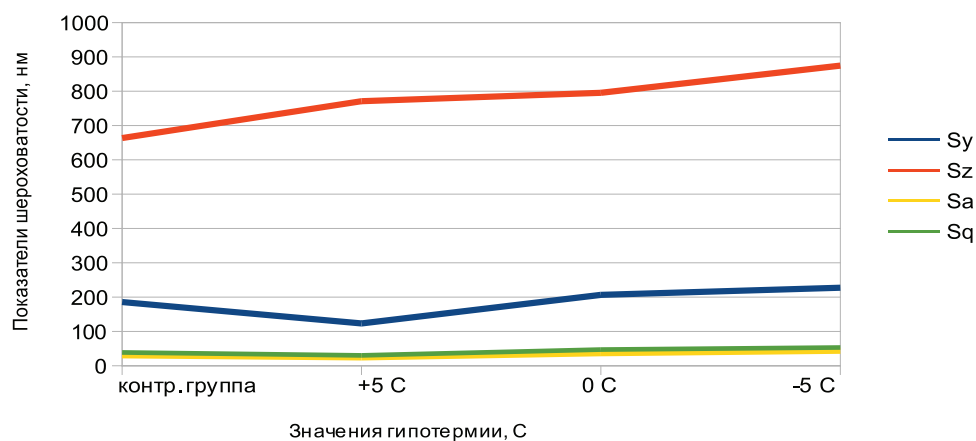


Рис. 5. Показатели шероховатости бактериальной поверхности при холодном шоке

Таким образом, стрессовое воздействие, вызванное гипотермией, привело к колебаниям показателей шероховатости поверхности микробных клеток. Снижение температуры культивирования до $+5^{\circ}\text{C}$ при-

водило к уменьшению шероховатости бактериальной поверхности по всем показателям. У бактерий, подвергшихся холодному воздействию при температурных показателях 0 и -5°C , наблюдалось термоиндуци-

рованное увеличение шероховатости бактериальной поверхности по сравнению с бациллами контрольной группы. Стрессовое воздействие низкими температурами вызвало увеличение показателя структурированности микробной поверхности за счет увеличения количества складок (показатель *Sz*) и их высоты (показатель *Sy*).

Список литературы

1. Багаева Т.В., Никифоров А.С., Зиннурова Е.Е. Стресс-индуцируемые изменения фосфолипидного состава цитоплазматических мембран сульфатредуцирующих бактерий // Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки. – 2011. – Т. 153, № 2. – С. 139–146.
2. Ерохин П.С., Уткин Д.В., Кузнецов О.С. Применение методов атомно-силовой микроскопии для определения воздействия антибактериальных препаратов на микробную клетку // Известия Саратовского университета. Серия Физика. – 2013. – Т. 13, № 2. – С. 29–33.
3. Журлов О.С., Гриценко В.А., Брудастов Ю.А. Влияние температуры культивирования на физиологические и физико-химические свойства *Escherichia coli* K12 // Вестник ОГУ. – 2009. – № 12. – С. 106–110.
4. Зайченко Н.А., Васильева И.В., Григорчук О.В. Анализ микрорельефа и шероховатости поверхности ионообменных мембран методом атомно-силовой микроскопии // Вестник ВГУ, серия: химия, биология, фармация. – 2009. – № 1. – С. 5–14.
5. Шелемех О.В. Ответные реакции микроорганизмов на одновременное воздействие нескольких стрессорных факторов: гипо- и гиперосмотических условий, гипоксии, неблагоприятных значений pH: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 2008. – 25 с.
6. Murata N., Los D.A., Membrane fluidity and temperature perception // *Plant Physiology*. – 1997. – № 115. – P. 875–879.
7. Cybulski L.E., Mansilla M.C., Aguilar P.S., Mendoza D. Mechanism of membrane fluidity optimization: isothermal control of the *Bacillus subtilis* acyl-lipid desaturase // *Molecular Microbiology*. – 2002. – № 45. – P. 1379–1388.

8. Los D.A., Murata N. Responses to cold shock in cyanobacteria // *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. – 1999. – № 1. – P. 221–230.

References

1. Bagaeva T.V., Nikiforov A.S., Zinnurova E.E. *Uchenye zapiski kazanskogo universiteta serija estestvennye nauki* Scientific Notes of Kazan University. Series of Natural Sciences, 2011, Vol. 153, no. 2, pp. 139–146.
2. Erohin P.S., Utkin D.V., Kuznecov O.S. *Izvestija saratovskogo universiteta serija fizika* // Journal of Saratov state university, 2013, Vol. 13, no 2, pp. 29–33.
3. Zhurlov O.S., Gricenko V.A., Brudastov Ju.A. *Vestnikogu-* Journal of Orenburg state university, 2009, no. 12, pp. 106–110.
4. Zajchenko N.A., Vasiljeva I.V., Grigorjuk O.V. *Vestnik vgu serija himija biologija farmacija* // Journal of Voronezh state university, 2009, no.1, pp. 5–14.
5. Shelemeh O.V. *Avto-ref. kand. biol. nauk*, 2008. 25 p.
6. Murata N., Los D.A., Membrane fluidity and temperature perception // *Plant Physiology*. 1997. no. 115. pp. 875–879.
7. Cybulski L.E., Mansilla M.C., Aguilar P.S., Mendoza D. Mechanism of membrane fluidity optimization: isothermal control of the *Bacillus subtilis* acyl-lipid desaturase // *Molecular Microbiology*. 2002. no. 45. pp. 1379–1388.
8. Los D.A., Murata N. Responses to cold shock in cyanobacteria // *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 1999. no. 1. pp. 221–230.

Рецензенты:

- Золотухин В.В., д.б.н., профессор кафедры зоологии, ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова», г. Ульяновск;
 Артемьева Е.А., д.б.н., профессор кафедры зоологии, ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова», г. Ульяновск.
 Работа поступила в редакцию 21.10.2014.