

УДК 576.3.314: 579.23.234

**ИССЛЕДОВАНИЕ МОРФОЛОГИИ ПОВЕРХНОСТИ КЛЕТОК  
AZOTOBACTER CHROOCOCCUM В УСЛОВИЯХ ГИПЕРТЕРМИИ МЕТОДОМ  
АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ**

**Ю.Ю. Гущина<sup>1</sup>, Л.Н. Олюнина<sup>2</sup>, Т.А. Гончарова<sup>2</sup>, А.П. Веселов<sup>2</sup>,**

**Ю.А. Мацкова<sup>2</sup>, М.А. Ежевская<sup>2</sup>**

*<sup>1</sup> - Научно-образовательный центр “Физика твердых наноструктур”  
Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского*

*<sup>2</sup> - Кафедра биохимии и физиологии растений Нижегородского государственного  
университета им. Н.И. Лобачевского*

Поступила в редакцию

Методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) исследованы морфологические параметры клеток *Azotobacter chroococcum*. Установлено, что размеры бактериальных клеток и структурированность их мембран изменяются в зависимости от величины и времени гипертермического воздействия. Для более резистентного типа клеток характерно термоиндуцированное уменьшение шероховатости поверхности и увеличение размеров. Выявленные изменения ориентированы на поддержание адаптивного потенциала у клеток бактерий в «жестких» условиях существования. Скорость и направленность этих изменений зависит как от возраста культуры, так и от условий культивирования.

**ВВЕДЕНИЕ**

В настоящее время большое внимание исследователей привлекает изучение механизмов ответа клеток прокариот на воздействие стрессирующих факторов различной природы. Некоторые из этих механизмов описаны достаточно подробно, тогда как ряд других процессов, приводящих к сохранению активности клеток в экстремальных

условиях, до сих пор недостаточно исследован. Так, например, остается мало изученной роль поверхностных структур, которые, являясь внешними барьерами клетки, должны в первую очередь претерпевать те или иные изменения под влиянием биотических и абиотических факторов среды. Это обусловлено их высокой структурной лабильностью и способностью быстро реагировать даже

на незначительные изменения в условиях существования [1].

В последнее время для изучения структуры клеток широко применяется атомно-силовая микроскопия (АСМ), дополняющая традиционные методы анализа биологических объектов [2-5]. В представленной работе оценивали возможности применения АСМ для сравнительного анализа поверхностной структуры прокариотических клеток в связи с действием экстремальных факторов.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА**

Объектом исследования служили клетки бактерий – чистая культура *Azotobacter chroococcum* 66 . Бактерии выращивали при 26°C на агаризованной среде Эшби. Клетки в экспоненциальной (односуточная культура) и стационарной (двухсуточная) фазах роста смывали с агара раствором хлорида натрия (0,15 М), либо раствором глюкозы (0,1М), центрифугировали (6000 об/мин, 15 мин), вновь суспендировали в указанных растворах и после выравнивания по оптической плотности подвергали тепловому шоку (ТШ). Диапазон использованных температур: 41°, 47° (для бактерий в экспоненциальной фазе роста); 44°, 47°, 50° (в стационарной фазе); экспозиция 10-40 мин. По окончании термошока бактерии высевали на твердую питательную среду,

культивировали в течение 48 часов при температуре, оптимальной для их роста (26°C), и путем подсчета образовавшихся макроколоний оценивали колониеобразующую способность (КОЕ) стрессированных клеток (контроль – бактерии, не подвергавшиеся ТШ).

Параллельно с регистрацией КОЕ осуществляли отбор материала для атомно-силовой микроскопии. На поверхность покровного стекла размером 6×6 мм наносили каплю суспензии бактерий в дистиллированной воде. Концентрацию бактерий в суспензии определяли по оптическому стандарту мутности. Она составляла  $10^9$  / мл. АСМ-исследования проводили после естественного высыхания образцов на воздухе на атомно-силовом микроскопе Solver Bio (NT-MDT) в неконтактном режиме. Использовались неконтактные кремниевые зонды серии NSG11 (NT-MDT) жесткостью 5,5 Н/м, резонансной частотой приблизительно 150 кГц, радиусом закругления 10 нм, высота зонда 10-20 мкм. Обработку полученных изображений и расчет средней шероховатости поверхности (среднего арифметического отклонения)  $R_a$  проводили с помощью программного обеспечения TermoMicroscopes SPM Lab.

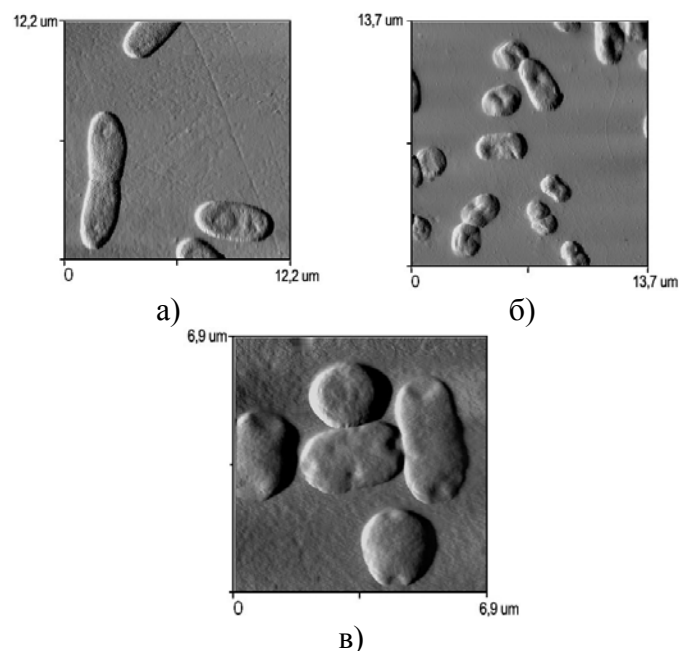
### **РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

Имеется достаточное количество работ по изучению бактерий методом атомно-силовой микроскопии, однако практически отсутствуют публикации по использованию АСМ для характеристики изменения их морфологии в экстремальных ситуациях. Основное преимущество зондовой микроскопии применительно к микробиологическим объектам – возможность их изучения в условиях, максимально приближенных к нативным.

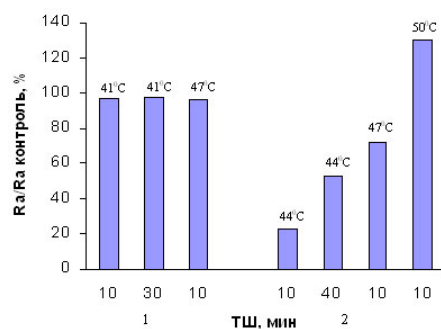
Из определителя бактерий Берджи известно, что клетки *Az. chroococcum* в экспоненциальной фазе роста имеет форму палочек с закругленными концами. По мере перехода к стационарной фазе развития колоний клетки приобретают кокковидную форму, располагаются одиночно, парами или в скоплениях. Средний диаметр клеток данного микроорганизма составляет 1,5-2,0 мкм [6]. АСМ-изображение *Az. chroococcum*, штамм 66 представлено на рис. 1а,б. Размеры бактерий исследуемого штамма составляют в экспоненциальной фазе роста – 2,0×1,3 мкм; в стационарной размер колеблется от 1,4×1,4 мкм до 1,8×1,8 мкм.

Изменение размеров и структурированности клеточной поверхности после гипертермического воздействия на клетки культуры *Az. chroococcum*, суспендированных в

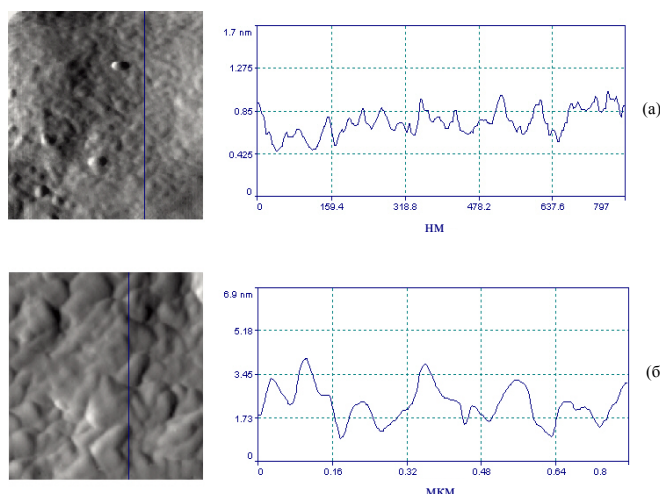
растворе NaCl (0,15M), находящейся на охарактеризованных выше стадиях роста, показано на рис. 1-4.



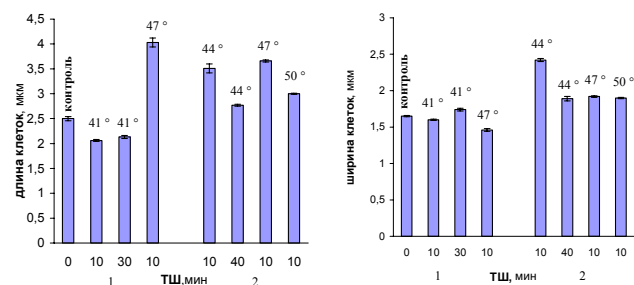
Из диаграмм видно, что изменения в структуре поверхности бактерий в экспоненциальной фазе роста колоний по всем параметрам были менее выраженными. В частности, десятиминутный прогрев суспензии бактерий данного варианта при 41° не вызывал заметных изменений шероховатости клеточной стенки. Однако следует отметить, что, в целом, морфология поверхности стала неравномерной, появились более гладкие участки, шероховатость которых снижена примерно в 1,5-2,0 раза. Сходные изменения обнаружены и при 47°C, 10 мин (Рис. 2).



У бактерий, подвергнутых тепловому шоку в стационарной фазе роста шероховатость их поверхности резко снижалась (44°C, 10 мин). С увеличением времени прогрева или величины температурного воздействия (47°C) этот эффект уменьшался; при 50°C наблюдалась обратная реакция – шероховатость становилась максимальной относительно контроля (Рис. 2). Клеточная стенка при этой дозе теплового шока имела хорошо выраженную структурированность (Рис. 4).

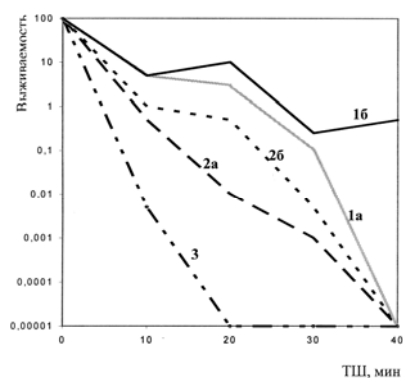


Воздействие повышенными температурами индуцировало изменение размеров клеток, преимущественно за счет изменения их длины (Рис. 3).



У бактерий, стрессированных в экспоненциальной фазе роста колоний, длина клеток увеличивалась только при тепловом шоке 47°C, 10 мин (в среднем в 1,6 раза); в стационарной фазе роста при десятиминутном прогреве – в среднем в 1,4 раза при 44°C и 47°C, в 1,2 раза при 50°C.

Наблюдались также и другие морфологические изменения, в частности, у стрессированных клеток (независимо от дозы гипертермического воздействия) зафиксировано появление вдавливания на полюсах, тогда как у контрольных бактерий подобных особенностей в структуре клеточной стенки не обнаружено (Рис.1в). Параллельное определение колониеобразующей способности (КОЕ) позволило выявить большую резистентность клеток, подвергнутых тепловому шоку в стационарной фазе роста.



Как видно из рис. 5, клетки односуточной культуры оказались чувствительнее к гипертермии. Их прогрев при 44°C в течение 40 мин полностью подавлял репродуцирующую активность, в варианте “термошок, двухсуточная культура” при такой же дозе воздействия она оставалась довольно высокой.

Сравнение результатов, полученных использованными в наших исследованиях методами, позволяет сделать вывод, что уменьшение структурированности поверхности, а также увеличение размеров клеток характерно для более терморезистентного типа бактериальных клеток. Мы полагаем, что смена направленности изменений вышеперечисленных параметров предшествует летальным дозам теплового шока, свидетельствуя об истощении адаптивного потенциала. Последний, по-видимому, выше у бактерий, находящихся на стационарной фазе развития колоний.

С целью интенсификации дыхания и энергетического обмена клеток

азотобактера в качестве среды ресуспендирования использовали раствор глюкозы (0,1 М) (Рис. 6-8).

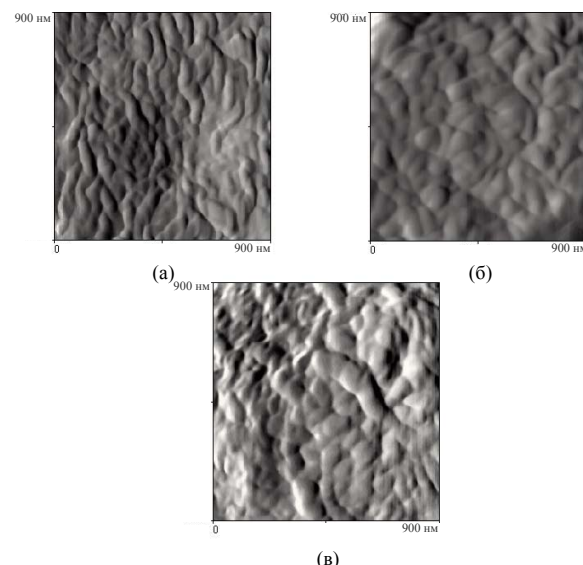


Рис 6.

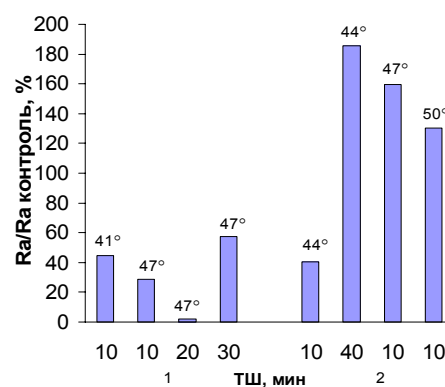


Рис 7.

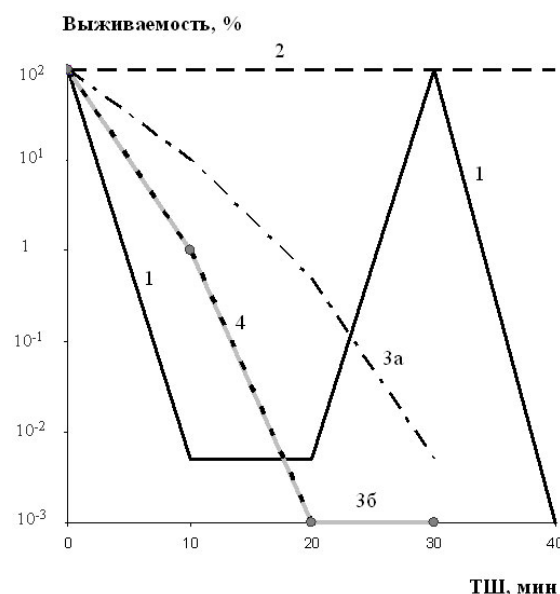


Рис 8.

Следует отметить, что в присутствии глюкозы, как в варианте «ТШ, односуточная культура», так и в варианте «ТШ, двухсуточная культура», не зависимо от дозы гипертермического воздействия, изменений размеров клеток по сравнению с контрольными не зафиксировано. Однако значения шероховатости зависели от дозы ТШ и от стадии развития колоний в момент действия стрессора. Так, в экспоненциальной фазе роста прогрев суспензии до 41°C уже при десятиминутной экспозиции приводил к снижению шероховатости (Ra) по всей поверхности скана в 2,3 раза; на отдельных участках эта разница еще более существенна (снижение в 3,9 раза). При прогреве суспензии клеток до 47°C в течение 20 мин параметр Ra минимален. С увеличением экспозиции до 30 минут средняя шероховатость клеточной стенки несколько возрастала, не достигая, однако, контрольного уровня (Рис. 7). Можно предположить, что на ранних стадиях развития колоний *Az. chroococcum* добавление в среду дополнительного энергетического субстрата способствует поддержанию адаптивного потенциала клеток в условиях повышенных температур. В варианте «ТШ, двухсуточная культура» динамика изменений исследованных параметров свидетельствует об обратном: после кратковременного периода

адаптации наступает быстрая декомпенсация защитных механизмов и ускоренная гибель клеточной культуры. Из рис. 8 видно, что при прогреве 47° выживаемость клеток двухсуточной культуры значительно ниже, чем клеток культуры, находящейся в экспоненциальной фазе роста в момент воздействия стрессора. При этом показатель шероховатости при 44° С (экспозиция 10 мин) был в 2,5 раза ниже контрольных значений. Дальнейшее увеличение дозы ТШ вызывало увеличение средней шероховатости клеточной стенки в 1,5 – 1,8 раза относительно контроля (рис. 7). Известно, что при переходе бактериальной культуры в стационарную фазу роста происходят существенные перестройки в сфере центральных метаболических путей, включающие репрессию ферментов цикла-трикарбоновых кислот и увеличение доли гликолиза в углеводном метаболизме [7]. Кроме того, гликолитические ферменты являются более терморезистентными, чем ферменты цикла-трикарбоновых кислот. Вероятно, в условиях термошока, добавление в суспензионную среду глюкозы приводит к еще большей активации гликолиза и, как следствие этого, к накоплению кислых продуктов обмена, снижению рН в клетке и целому ряду других процессов, влияющих на терморезистентность.

Итак, известно, что химический состав, строение клеточной стенки постоянны для определенного вида бактерий, однако, как показали наши исследования, в ее структуре могут происходить быстрые модификации. Эти изменения (их скорость, направленность) зависят как от возраста культуры, так и условий культивирования и ориентированы на сохранение функциональной активности бактерий в «жестких» условиях существования, в частности, при резкой смене температурного режима.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Проведено изучение морфологических параметров клеток бактерий *Azotobacter chroococcum* методом атомно-силовой микроскопии. Установлено, что размеры клеток, структурированность их поверхности изменяются в зависимости от величины и времени внешнего воздействия (тепловой шок). Уменьшение структурированности поверхности, а также увеличение размеров клеток характерно для более терморезистентной стадии в развитии культуры (стационарная фаза роста). Смена направленности в изменении вышеперечисленных параметров предшествует летальным дозам теплового шока, свидетельствуя об истощении адаптивного потенциала.

Последний может быть повышен добавлением дополнительного энергетического субстрата в среду

культивирования *Azotobacter chroococcum* на ранних стадиях развития колоний.

Таким образом, метод АСМ позволил зарегистрировать изменения поверхностных структур клеток *Azotobacter chroococcum*, направленные на сохранение функциональной активности бактерий при смене температурного режима.

Работа поддержана грантом REC-NN-001 программы “Фундаментальные исследования и высшее образование в России”.