

ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ В ИЗУЧЕНИИ МИКРОФЛОРЫ ПОЧВ

Исследована возможность использования атомно-силовой микроскопии в изучении бактериальных морфотипов обитающих в черноземе. В почве выявлено преобладание палочковидных и кокковидных форм. Количество наноразмерных бактерий превышало количество микро-размерных объектов.

Ключевые слова: почвенная микрофлора, атомно-силовая микроскопия.

Методы атомно-силовой микроскопии (АСМ) находят все более широкое применение в биологии, медицине и фармакологии. С помощью АСМ можно осуществлять измерения не только в вакууме и воздухе, но и в атмосфере любого газа, и даже в капле жидкости, что позволяет применить этот метод для изучения органических молекул и живых клеток.[1] В настоящее время используя АСМ осуществили визуализацию таких бактериальных клеток как: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, *Lactobacillus fermentum* и *Bifidobacterium longum*. [2] Однако, этот список еще очень мал по сравнению с количеством существующих видов микроорганизмов, особенно обитающих в природных средах. Поэтому мы посчитали целесообразным использовать атомно-силовую микроскопию для изучения микрофлоры природных сред, а именно для визуализации морфотипов бактериальных клеток, заселяющих почву.

Материалы и методы исследования

В качестве объектов исследования был использован чернозем обыкновенный маломощный среднегумусный на тяжелосуглинистых породах (пашня), расположенный в ботаническом саду г. Оренбурга. Отбор образцов почвы проводили по стандартной методике с поверхности и глубины 20 см.

Общее количество микроорганизмов в почве определяли с помощью метода люминесцентной микроскопии по Д.Г. Звягинцеву (2005 г.) [3]. Перед сканированием почвенную вытяжку фильтровали через фильтровальную бумагу, затем центрифугировали в режиме 13 тыс. об/мин в течение 10 минут, после чего дезинтегрировали суспензию в ультразвуковой ванне в течение 5 мин. Полученная суспензия в объеме 5 мкл переносилась на подложку – скол слюды. После высыхания приступали к сканированию. Сканирование образцов производилось на атомно-силовом микроскопе «SMM-2000» (ЗАО Протон-МИЭТ, Россия). В процессе сканирования использовались стандартные кантилеверы для контактной моды MSCT-

AUNM (Park Scientific, США), жесткость используемых кантилеверов 0,03 N/m, толщина балок 0,6 мкм, ширина – 20 мкм, высота игл – 3 мкм, радиус закругления игл – 30-60 нм. Для вычисления жесткости визуализированных объектов использовалась программа Origin 7.5 Pro (MicroCAL Origin 7.5 Pro, OriginLab Corporation).

Результаты

Предварительные исследования почвенных образцов показали, что общая численность микроорганизмов в поверхностном слое целинной почвы превышала численность бактерий на глубине 20 см. (таблица 1)

В ходе исследования было проанализировано 16 почвенных образцов, с использованием АСМ, было обнаружено преобладание палочковидных и кокковидных форм бактериальных клеток. Палочковидные формы клеток встречались в 56,73% случаев (274), а кокковидные – в 27,33% (132). Помимо перечисленных морфотипов встречались извитые формы в 11,39% (55) случаев, в остальных случаях – другие формы не отнесенные к вышеуказанным морфотипам. Результаты, полученные с помощью атомно-силовой микроскопии, не выявили существенных различий в количестве клеток и отличиях морфотипов микроорганизмов в поверхностных слоях почвы и на глубине. Возможно, это объяснить особенностью распределения клеток на слюде, а также случайным выбором полей зрения, увеличив количество наблюдений, этого можно будет избежать.

Кроме типичных бактериальных клеток, размер которых превышали 1 мкм, были обнаружены объекты менее 1 мкм (от 150 нм до 600 нм), кото-

Таблица 1. Общая численность микроорганизмов в исследуемых почвенных образцах

Объект исследования	ОМЧ клеток/г (10^8)
Целинная поверхностный слой	8,95±0,45
Целинная почва глубина 20 см	7,51±0,5

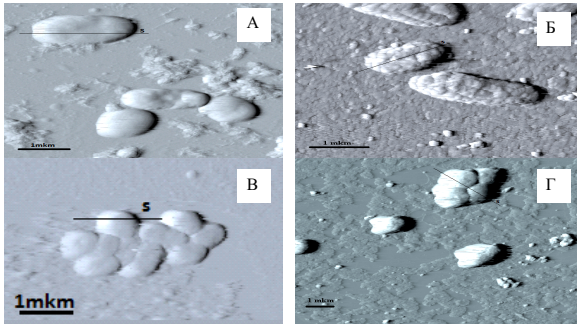


Рисунок 1. Морфология палочковидных бактерий (А, Б) и кокковидных бактерий (В, Г) в почве

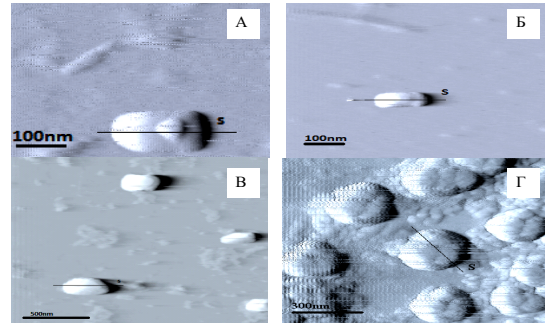


Рисунок 2. Морфология наноразмерных палочковидных бактерий (А, Б, В) и кокковидных бактерий (Г) в почве

рые были отнесены к наноразмерным, их количество в 3,3 раза превышало количество типичных бактерий (370 против 113).

Исследования с помощью АСМ таких характеристик клеток как жесткость позволяет разделять биологические и абиотические объекты в природных средах. [4,5] Изучение подобных свойств у обнаруженных клеток показало, что же-

сткость микроразмерных объектов (более 1 мкм) изменялась в диапазоне от 14 МПа до 25 МПа, а жесткость наноразмерных объектов лежит в области от 50 МПа до 76 МПа. Сравнение упругих характеристик клеток и подложки (слоды) (86 – 90 МПа) позволило отнести обнаруженные клетки к биологическим объектам.

14.09.2011

Список литературы:

1. Binning G., Quate C.F., Gerber C. Atomic force microscopy // *Phys. Rev. Lett.* – 1986. -V. 56. – № 9, – P. 930-933.
2. Бинниг Г., Рорер Г. Сканирующая туннельная микроскопия – от рождения к юности // *УФН.* – 1988. – Т. 154. – № 2. – С. 261-277.
3. Звягинцев Д.Г., Бабьева И.П., Зенова Г.М. Биология почв: Учебник. – 3-е изд., испр. и доп. // М.: Изд-во МГУ. – 2005. – 445 с, илл. – (Классический университетский учебник).
4. Mozhanova A.A., Nurgazizov N.I., Bukharaev A.A. Local elastic properties of biological materials studied by SFM // *SPM-2003, Proceedings. Nizhni Novgorod, March 2-5.* – 2003. – P. 266.
5. Kuznetsova T.G., Starodubtseva M.N., Yegorenkov N.I., Chizhik S.A., Zhdanov R.I. Atomic force microscopy probing of cell elasticity // *Micron* 38 – 2007. – P. 824-833

Сведения об авторах:

Мисетов Иосиф Александрович, доцент кафедры микробиологии
Оренбургского государственного университета, к.м.н. e-mail: iosifam@gmail.com
Калашникова Марина Викторовна, студентка кафедры микробиологии
Оренбургского государственного университета
Алехина Гелена Петровна, доцент кафедры общей биологии
Оренбургского государственного университета, к.б.н.
460018, г. Оренбург, пр-т Победы, 13

Misetov I.A., Kalashnikova M.V., Alekhina G.P.

Orenburg state university, e-mail: iosifam@gmail.com

THE POSSIBILITY OF USING ATOMIC FORCE MICROSCOPY TO STUDY SOIL MICROFLORA

The possibility of using atomic force microscopy to study bacterial morphotypes found in black soil. In the soil revealed the predominance of rod-shaped and coccoid forms. The number of bacteria exceeded the number of nano-sized objects micron.

Key words: soil microflora, atomic force microscopy.

Bibliography:

1. Binning G., Quate C.F., Gerber C. Atomic force microscopy // *Phys. Rev. Lett.* – 1986. -V. 56. – № 9, – P. 930-933.
2. Binnig G., Rohrer H. Scanning tunneling microscopy – from birth to adolescence // *UFN.* – 1988. – Т. 154. – № 2 – P. 261-277.
3. Zvyagintsev D.G., Babeva I.P., Zenov G.M. Soil Biology: A Textbook. – 3rd ed., Rev. and add. // Moscow: Moscow State University. – 2005. – 445. ill. – (Classics university textbook).
4. Mozhanova A.A., Nurgazizov N.I., Bukharaev A.A. Local elastic properties of biological materials studied by SFM // *SPM-2003, Proceedings. Nizhni Novgorod, March 2-5.* – 2003. – P. 266.
5. Kuznetsova T.G., Starodubtseva M.N., Yegorenkov N.I., Chizhik S.A., Zhdanov R.I. Atomic force microscopy probing of cell elasticity // *Micron* 38 – 2007. – P. 824-833