

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ БАКТЕРИЙ *BACILLUS CEREUS* НА РАЗЛИЧНЫХ ЭТАПАХ ЖИЗНЕННОГО ЦИКЛА

С использованием атомно-силовой микроскопии (АСМ) были исследованы особенности жизненного цикла грамположительных спорообразующих микроорганизмов *Bacillus cereus* IP 5832. Описаны изменения морфологии и механических параметров бактериальных клеток на различных этапах их жизненного цикла. Показано, что количество микроорганизмов с неизменной морфологией снижается уже к 5 суткам культивирования, а к 15 суткам в популяции не остается неповрежденных бактериальных клеток, при этом детектируется присутствие спор – морфологически дифференцированных покоящихся форм микроорганизмов.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, бактерии, жизненный цикл, длительное культивирование.

Жизненный цикл микроорганизмов на протяжении многих лет является предметом изучения микробиологов, однако и к настоящему моменту продолжают проводиться исследования, посвященные разнообразным особенностям возрастных изменений бактериальных клеток [1]. При этом решение поставленных задач осуществляется благодаря появлению или совершенствованию соответствующих методов исследования. Так физиологические аспекты длительного культивирования микроорганизмов к настоящему времени изучены наиболее детально, при этом показано, что процесс старения является для микроорганизмов своего рода стрессом, в ответ на который бактерии вырабатывают определенные сигнальные молекулы, запускающие ряд адаптивных механизмов [2]. Совершенствование молекулярных подходов позволило изучить особенности деления и старения микробных клеток на генетическом уровне [3]. Морфология бактериальных клеток наряду с генетическими и биохимическими показателями является важным параметром, характеризующим состояние бактериальной популяции при различных биотических и абиотических стрессорных воздействиях [4]. Изучение морфологии микроорганизмов традиционно ведется посредством различных микроскопических методов. Так использование оптической микроскопии позволяет исследовать бактериальные клетки, находящиеся в прижизненном состоянии, а в сочетании с флуоресцентными методами окраски оценивать их физиологическое состояние. Ограничение в данном случае свя-

зано с низким латеральным разрешением оптической микроскопии, не позволяющим фиксировать тонкие морфологические изменения микробных клеток. Данное ограничение удается преодолеть с использованием электронной микроскопии, однако в этом случае специфика пробоподготовки образцов переводит микробные клетки в состояние далекое от нативного. Атомно-силовая микроскопия сочетает в себе достоинства оптической и электронной микроскопии и позволяет изучать ультраструктуру бактериальных клеток в их прижизненном состоянии.

Целью данного исследования явилось изучение особенностей морфологических и механических изменений бактериальных клеток на различных сроках их культивирования.

Материалы и методы

При проведении настоящего исследования использовался музейный штамм *Bacillus cereus* IP 5832, культивирование которого осуществлялось на жидкой питательной среде LB («Sigma-Aldrich», США) при 37 °С. По истечении 12, 24 часов; 5, 10, 15 суток культивирования для приготовления образцов отбиралась суспензия бактериальных клеток в объеме 1 мл. Препараты для АСМ готовились путем двойной седиментационной отмывки бактериальной биомассы дистиллированной водой при 4000 g в течение 5 минут. После чего на подложку из свежесколотой слюды наносилась суспензия бактериальных клеток.

Полученные образцы исследовали методом атомно-силовой микроскопии в контакт-

ном режиме с использованием мульти-микроскопа SMM-2000 (ОАО «Завод ПРОТОН-МИЭТ», Россия). В процессе сканирования использовались кантилеверы MSCT-AUNM («Veeco Instruments Inc.», США) с жесткостью балки 0,03 Н/м и радиусом кривизны иглы порядка 10 нм. Количественный морфометрический анализ полученных изображений проводили с использованием штатного программного обеспечения микроскопа.

Исследование упругих свойств бактериальных клеток проводилось с использованием АСМ в режиме силовой спектроскопии, при котором происходит снятие зависимостей прогиба кантилевера от расстояния между концом иглы и поверхностью образца. Получаемые в процессе измерений так называемые «кривые подвода» представляют собой графическое отображение зависимости отклонения кантилевера от его перемещения по вертикальной оси Z. Алгоритм исследования включал в себя предварительное получение кривых подвода с объекта, упругость которого превышает константу упругости кантилевера (k_c), в качестве такового выступала поверхность свежесколотой слюды. В этом случае предполагается, что движение сканера по оси Z (Δz) сопровождается пропорциональным отклонением кантилевера (Δd). В свою очередь в случае «мягкого» образца ($k_o < k_c$) отклонение кантилевера оказывается несимметричным движению сканера ($\Delta z > \Delta d$), поскольку поверхность объекта «продавливается» зондом. Зарегистрированные показатели в дальнейшем используются для вычисления глубины продавливания как $\delta = \Delta z - \Delta d$ с последующим расчетом модуля Юнга по модели Герца [5], описывающей контактную деформацию двух тел. При этом исходная формула (1) выражала зависимость между действующей на объект силой (F) и глубиной его продавливания (δ):

$$F = \frac{4}{3} \frac{E}{1 - \nu^2} \delta^{3/2} \sqrt{R}, \quad (1)$$

где F – приложенная сила, E – модуль Юнга, ν – коэффициент Пуассона, δ – продавливание, R – радиус иглы. Коэффициент Пуассона для бактериальных клеток равен 0,5.

Полученные результаты обработаны методами вариационной статистики с использованием модульной программы «Attestat».

Результаты

Атомно-силовая микроскопия бактериальных клеток позволила оценить морфологический состав популяции *B. cereus*, находящейся в различных стадиях своего жизненного цикла. На начальном этапе культивирования (12 часов) микроорганизмы, входящие в состав популяции, характеризовались преимущественно однородной морфологией. Большинство визуализированных бактерий описывались как объекты палочковидной формы с закругленными концами, клетки при этом располагались преимущественно в цепочках различной длины. Морфометрическое исследование позволило зафиксировать средние значения размерных параметров бактерий, составивших $1,78 \pm 0,31$ мкм в длину, $1,10 \pm 0,16$ мкм в ширину и $0,37 \pm 0,18$ мкм в высоту, рассчитанный на этой основе средний объем клеток оказался равным $0,38 \pm 0,13$ мкм³.

Поверхность клеточной стенки при ее визуализации с нанометровым разрешением оказалась относительно гладкой с малоразвитым рельефом, среднеквадратичная шероховатость которого составила $1,03 \pm 0,16$ нм. Оцененные посредством АСМ упруго-механические свойства клеток и выраженные в численной форме оказались порядка 6 МПа (рис 1).

В свою очередь, культивирование в течении 24 часов сопровождалось процессом дальнейшего роста бактериальных клеток, что детектировалось по увеличению их размерных параметров (таблица 1). В то же время значимых изменений морфологического состава популяции бактерий не зафиксировано (рис. 2 Г). Визуализация клеточной поверхности (рис. 2 Д, Е) позволила детектировать незначительное увеличение ее шероховатости до $1,35 \pm 0,39$ нм. Механические параметры отдельных клеток также не терпели значимых изменений (рис. 1).

На пятые сутки культивирования популяция *B. cereus* оказалась значительно более гетерогенной по морфологии и механическим свойствам входящих в ее состав бактериальных клеток (рисунок 2 Ж). Общим моментом для всех микроорганизмов, находящихся в популяции, оказывалось еще большее увеличение их длины (табл. 1). При этом 65% клеток сохраняли форму и упругие свойства, характерные для бактерий, находящихся в начальном периоде культивирования, оставшаяся часть клеток характеризовалась существенно измененной морфологией. Средние значения размерных параметров подобных форм клеток указывают в табли-

це 1. На рисунке 2 З представлено характерное изображение клетки *B. cereus*, находящейся в процессе старения. Бактерии подобного типа характеризовались сниженными значениями высоты и развитым рельефом поверхности (рис. 2 И), среднее значение шероховатости которого оказывается равным $6,23 \pm 1,08$ нм. Их дополнительной особенностью являлись сниженные до $2,5$ МПа значения модуля Юнга (рис. 1).

К 10 суткам культивирования количество неповрежденных клеток существенно сокращается, их доля в общем числе визуализированных объектов составляет не более 15% (рис. 2 К). Преобладающим морфотипом среди бактерий оказываются объекты со значительно сниженными значениями высоты и существенно возросшими до $14,81 \pm 5,00$ нм значениями шероховатости поверхности. Значения модуля Юнга также возросли до 10 МПа. Посредством атомно-силовой микроскопии в ряде случаев на поверхности таких клеток детектировалось разрушение и отрыв предположительно слоев пептидогликана (рис. 2 М).

К 15 суткам большая часть визуализируемых полей образца культуры *B. cereus* была заполнена «клеточным мусором», представляющим собой остатки бактериальных клеточных стенок и их внутриклеточное содержимое (рис. 2 Н). Бактериальные клетки с характерной для бацилл морфологией детектировались в единичных случаях. В то же время в значительном количестве фиксировались объекты (рис. 2 О) длиной до $1,51 \pm 0,10$ мкм, шириной $1,00 \pm 0,10$ мкм и высотой до $0,46 \pm 0,43$ мкм. Ультраструктура их поверхности (рис. 2 П) характеризовалась значительной шероховатостью ($15,00 \pm 2,60$ нм).

Обсуждение

В данной работе мы исследовали особенности процесса старения бактериальной популяции при длительном культивировании. По-

явление атомно-силовой микроскопии в арсенале микробиологов позволило перейти от микробиологии сообществ к микробиологии единичных клеток [6]. В данной работе выбор АСМ в качестве метода исследования позволил охарактеризовать качественные и количественные изменения бактериальной популяции, культивируемой длительное время, и оценить изменения морфологических свойств отдельных составляющих ее бактериальных клеток.

На первом этапе с использованием АСМ была охарактеризована популяция *B. cereus* на этапе ранней стационарной фазы, когда процессы роста еще не закончены и количество вновь образуемых клеток превышает количество отмирающих. В этот период визуализированные бактериальные клетки характеризовались характерной для данного вида формой клеток [7]. Возможности атомно-силовой микроскопии позволили изучить ультраструктуру поверхности исследуемых микроорганизмов. В целом поверхности клеток *B. cereus* были гладкими, что является характерным признаком грамположительных бак-

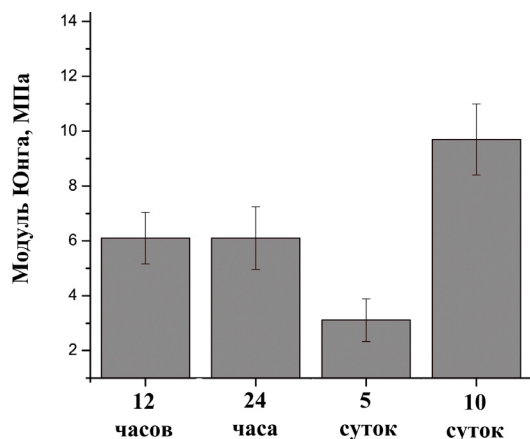


Рисунок 1. Модуль Юнга бактериальных клеток популяции *Bacillus cereus* IP5832 при различных сроках культивирования

Таблица 1. Морфологические параметры бактерий *Bacillus cereus* IP 5832 при различных сроках культивирования

Время культивирования	Морфологические параметры				
	Длина (мкм)	Ширина (мкм)	Высота (мкм)	Объем (мкм³)	Шероховатость (нм)
12 ч.	1,78±0,31	1,10±0,16	0,37±0,18	0,38±0,13	1,03±0,16
24 ч.	2,23±0,26*	1,17±0,18	0,44±0,69*	0,58±0,14*	1,35±0,39
5 сут.	2,99±0,72*	1,27±0,12	0,28±0,74*	0,53±0,20*	6,23±1,08*
10 сут.	2,97±0,63*	1,41±0,14*	0,13±0,46*	0,26±0,07*	14,81±5,00*
15 сут.	1,51±0,10	1,00±0,10	0,46±0,43*	0,35±0,04	15,00±2,60*

Примечание. * — $p < 0,05$ (критерий Уилкоксона)

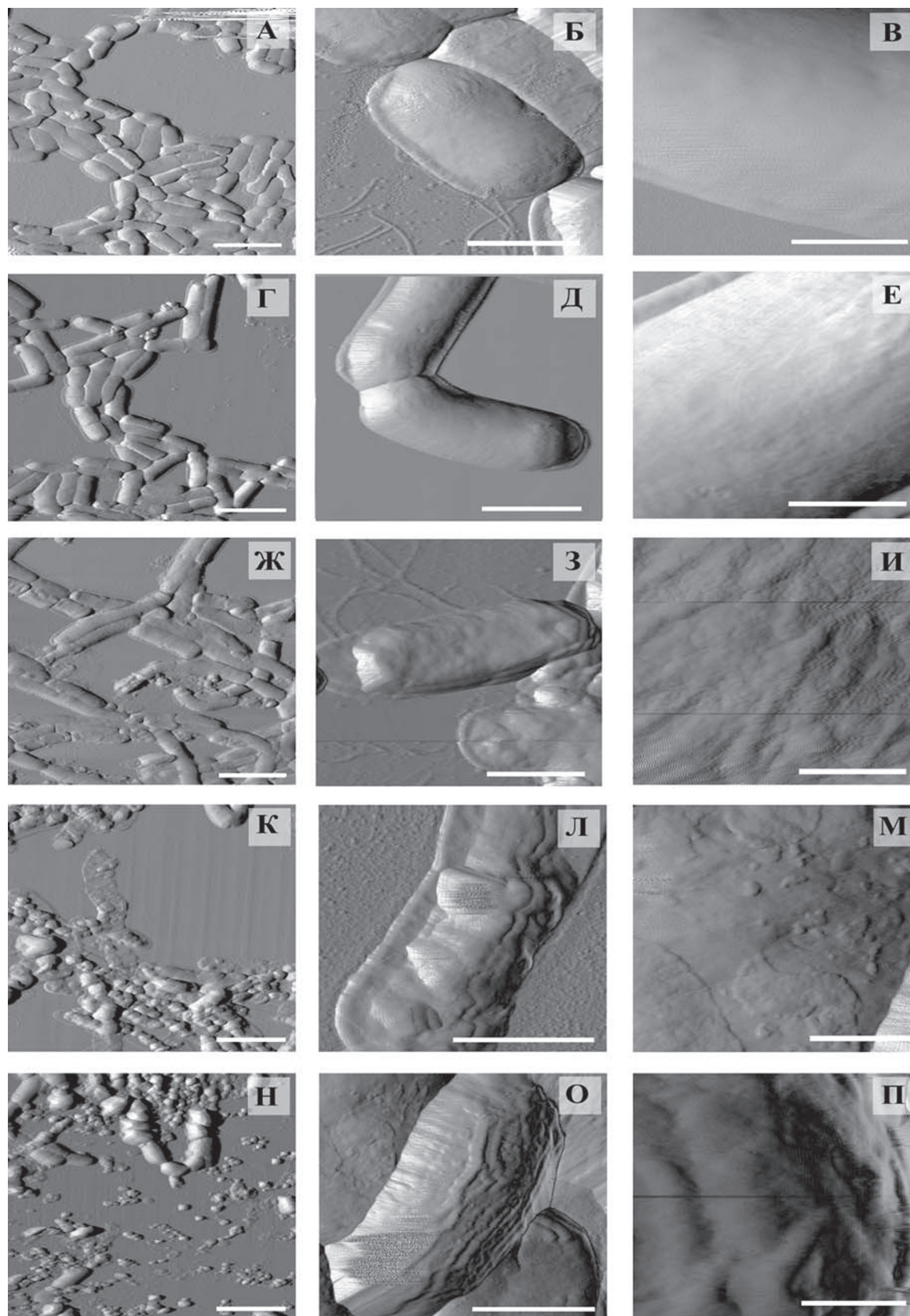


Рисунок 2. АСМ-изображения клеток бактериальной популяции *Bacillus cereus* IP5832 при различных сроках культивирования: А–В – 24 ч., Г–Е – 48 ч., Ж–И – 5 сут., К–М – 10 сут., Н–П – 15 сут. Шкала (А, Г, Ж, К, Н) – 2 мкм; шкала (Б, Д, З, Л, О) – 1 мкм; шкала (В, Е, И, М, П) – 250 нм.

терий и определяется особенностью строения клеточной стенки подобного типа [8]. Возможности АСМ не исчерпываются визуализацией объектов, метод позволяет исследовать их упругие свойства. Оценивая посредством АСМ упруго-механические свойства клеток, их итоговые значения, выраженные в численной форме, также оказались характерными для грамположительных бактерий *Bacillus cereus* [7]. Описывая всю популяцию клеток, культивируемых в течение 12 часов, была выявлена относительная морфологическая однородность составляющих ее клеток, что свидетельствовало об относительной молодости бактериальной культуры.

При дальнейшем культивировании продолжается и рост бактериальных клеток, что было зафиксировано посредством АСМ при морфометрическом исследовании их размерных параметров. В то же время рост микроорганизмов не сопровождался изменением их механических свойств, что свидетельствовало о завершенности процессов синтеза пептидогликана клеточной стенки.

Жизненный цикл бактерий, культивируемых еще более продолжительное время, может быть описан термином длительной (англ. long-term) стационарной фазы [9]. К этому времени посредством атомно-силовой микроскопии оказалось возможным провести дифференцировку составляющих популяцию бактерий по их возрастным изменениям и охарактеризовать различные этапы морфологических и механических изменений микроорганизмов в процессе их старения.

В целом большая часть клеток в популяции с учетом их размерных параметров, морфологии клеточной стенки и упругих свойств оставалась неповрежденной. В отношении оставшейся части микроорганизмов наблюдались различные значительные изменения, являющиеся результатом действия аутолитических ферментов, разрушающих клеточную стенку бактериальной клетки в процессе ее старения. При этом микробная клетка частично или полностью теряет свое внутриклеточное содержимое, что и детектировалось посредством АСМ как снижение высоты клеток, увеличение шероховатости ее поверхности, а также изменением механической

прочности. При этом степень изменения механических свойств клеток зависит от состояния их барьерных структур и количества внутриклеточного содержимого. Так клетки к 5 суткам культивирования оказывались более мягкими объектами по сравнению с культивируемыми 10 суток и более. В первом случае низкие значения модуля Юнга являлись следствием разрушения пептидогликанового остова клеточной стенки и частичной потери внутриклеточного содержимого. А во втором случае более высокие значения модуля Юнга характеризуют полную потерю цитоплазматического содержимого бактериальной клетки, при этом на зонд микроскопа оказывает влияние твердый субстрат подложки.

Увеличение продолжительности сроков культивирования ведет к сокращению доли жизнеспособных клеток в популяции и появлению морфологически дифференцированных форм покоя – спор. Подобные объекты характеризовались значительно большими значениями высоты и меньшими значениями длины и ширины. Поверхность подобных объектов оказывалась покрыта экзоспориумом с характерной для спор, образуемых бактериями рода *B. cereus*, [10, 11] морфологией. В свою очередь, количество визуализированных спор значительно меньше первоначального числа составляющих популяцию бактериальных клеток, свидетельствуя таким образом, что переход в покоящееся состояние претерпевают не все клетки бактериальной популяции

Заключение

Таким образом, с использованием атомно-силовой микроскопии с высоким пространственным разрешением были исследованы грамположительные микроорганизмы в динамике их длительного культивирования. Основные результаты демонстрируют изменение морфологии клеток и их механических свойств в процессе старения микробных клеток, показано, что зафиксированные изменения являются следствием нарушения основной барьерной функции оболочек клеток. Характеризуя бактериальную популяцию в целом, показано значительное уменьшение жизнеспособных клеток уже к 10 суткам культивирования и появление значительного количества спор к 15 суткам.

16.08.2012

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России», номер государственного соглашения 14.A18.21.0185

Список литературы:

1. Rang C.U., Peng A.Y., Chao L. Report temporal dynamics of bacterial aging and rejuvenation // *Current Biology*. – 2011. – V. 21, №21. – P. 1813–1816.
2. Смоленцева О.А., Яруллина Д.Р., Ильинская О.Н. Индукция синтеза NO у лактобацилл в условиях стресса // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2012. – №1. – С. 25–29.
3. Rang C.U., Peng A.Y., Poon A.F., Chao L. Ageing in *Escherichia coli* requires damage by an extrinsic agent // *Microbiology*. – 2012. – V. 158. – P. 1553–1559.
4. Vasilchenko A.S., Nikiyan H.N., Deryabin D.G. Atomic force microscopy study of magainin 2 versus human platelet extract action on *Escherichia coli* and *Bacillus cereus* // *Journal of Biological Research-Thessaloniki*. – 2013. – V. 19. – P. 3–9.
5. Hertz, H. Ueber die Berührung Fester Elastischer Körper (On the contact of elastic solids) // *J. Reine Angew.* – 1881. – №92. – P. 156–171.
6. Brehm-Stecher, B.F. Single-Cell Microbiology: Tools, technologies, and applications // *Microbiology and molecular biology reviews*. – 2004. – V. 68, №3. – P. 538–559.
7. Nikiyan H., Vasilchenko A., Deryabin D. Humidity-dependent bacterial cells functional morphometry investigations using atomic force microscope // *International journal of microbiology*. – 2010. – doi:10.1155/2010/704170
8. Hayhurst E.J., Kailas L., Hobbs J.K., Foster S.J. Cell wall peptidoglycan architecture in *Bacillus subtilis* // *PNAS*. – 2008. – V. 105, №38. – P. 14603–14608.
9. Finkel, S.E. Long-term survival during stationary phase: evolution and the GASP phenotype // *Nature*. – 2006. – V. 4. – P. 113–120.
10. Aronson A.I., Fitz-James P. Structure and morphogenesis of the bacterial spore coat // *Bacteriol. Rev.* – 1976. – V. 40. – P. 360–402.
11. Plomp M., Leighton T.J., Wheeler K.E., Malkin A.J. The high-resolution architecture and structural dynamics of *Bacillus* spores // *Biophysical journal*. – 2005. – V. 8, №1. – P. 603–608.

Сведения об авторах:

Васильченко Алексей Сергеевич, старший преподаватель кафедры биохимической физики
Оренбургского государственного университета, кандидат биологических наук
e-mail: avasilchenko@gmail.com

Яруллина Дина Рашидовна, старший преподаватель кафедры микробиологии
Казанского (Приволжского) федерального университета, кандидат биологических наук
420008, г. Казань, Кремлевская, 18, e-mail: kasfes@gmail.com

Никиян Айк Николаевич, доцент кафедры биохимической физики
Оренбургского государственного университета, кандидат физико-математических наук

Тесля Анастасия Валерьевна, старший преподаватель кафедры общей биологии
Оренбургского государственного университета, кандидат биологических наук

UDC 579.24

Vasilchenko A.S., Yarullina D.R., Nikiyan H.N., Teslya A.V.

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

MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF THE BACTERIA *BACILLUS CEREUS* AT VARIOUS STAGES OF THE LIFE CYCLE

Using atomic force microscopy (AFM) the life cycle of spore-forming Gram-positive organisms *Bacillus cereus* IP 5832 was investigated. The morphological and mechanical changes of single bacterial cells by their long-term culturing were described. It is shown decreasing the number of viable cells at the 5 day of cultivation and no viable cells in bacterial population at 15 day. In this case, the presence of spores which are morphologically differentiated forms of resting cells was revealed by AFM.

Key words: atomic force microscopy, life cycle, mechanical properties, bacterial cells, long-term culturing.