

# БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

УДК 579:53.086

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ МОРФОМЕТРИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

**Драгун Кристина Александровна**, студент, направление подготовки 12.03.04 Биотехнические системы и технологии, Оренбургский государственный университет, Оренбург  
e-mail: dragun\_kristina@list.ru

**Никиян Аик Николаевич**, кандидат физико-математических наук, доцент, доцент кафедры медико-биологической техники, Оренбургский государственный университет, Оренбург  
e-mail: nikiyan@yahoo.com

**Давыдова Ольга Константиновна**, кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры биохимии и микробиологии, Оренбургский государственный университет, Оренбург  
e-mail: okdavydova@yahoo.com

***Аннотация.** В настоящей работе представлены результаты сравнительной морфометрии бактериальных клеток *B. subtilis* до и после воздействия солями тяжелых металлов. Для визуализации и количественного анализа использовался современный метод контактной атомно-силовой микроскопии. В ходе выполнения работы установлены оптимальные методы пробоподготовки и параметры сканирования клеточных образцов. Показано статистически значимое различие по всем измеряемым параметрам (ширина, длина, высота и шероховатость клеточной стенки) у контрольной и опытной групп микроорганизмов, что свидетельствует об адекватности метода атомно-силовой микроскопии в сравнительных исследованиях морфологии микроорганизмов при различных воздействиях.*

***Ключевые слова:** сравнительная морфометрия, атомно-силовая микроскопия, морфологические параметры, *Vacillus subtilis*.*

***Для цитирования:** Драгун К. А., Никиян А. Н., Давыдова О. К. Сравнительная морфометрия микроорганизмов методом атомно-силовой микроскопии // Шаг в науку. – 2022. – № 1. – С. 17–20.*

## COMPARATIVE MORPHOMETRY OF MICROORGANISMS BY ATOMIC-FORCE MICROSCOPY

**Dragun Kristina Alexandrovna**, student, training program 12.03.04 Biotechnical systems and technologies, Orenburg State University, Orenburg  
e-mail: dragun\_kristina@list.ru

**Nikiyan Aik Nikolaevich**, Candidate of Physical and Mathematical Sciences, Associate Professor, Associate Professor of the Department of Biomedical Engineering, Orenburg State University, Orenburg  
e-mail: nikiyan@yahoo.com

**Davydova Olga Konstantinovna**, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Associate Professor of the Department of Biochemistry and Microbiology, Orenburg State University, Orenburg  
e-mail: okdavydova@yahoo.com

***Abstract.** This work presents the results of a comparative morphometry of *B. subtilis* bacterial cells before and after exposure of heavy metal salts. For visualization and quantitative analysis, a modern method of contact atomic force microscopy was used. In the course of the work, the optimal methods of sample preparation and scanning parameters of cell samples were established. A statistically significant difference was shown for all measured parameters (width, length, height and roughness of the cell wall) in the control and experimental groups*

*of microorganisms, which indicates the adequacy of the atomic force microscopy method in comparative studies of microorganisms' morphology under various influences.*

**Key words:** comparative morphometry, atomic force microscopy, morphological parameters, *Bacillus subtilis*.

**Cite as:** Dragun, K. A., Nikiyan, A. N., Davydova, O. K. (2022) [Comparative morphometry of microorganisms by atomic-force microscopy]. *Shag v nauku* [Step into Science]. Vol. 1, pp. 17–20.

Развитие микробиологии, как науки, изучающей строение, жизнедеятельность и экологию микроорганизмов, невозможно представить без микроскопических методов исследования. Так, именно с первым описанием бактериальных клеток, увиденных с помощью оптического микроскопа Антония Ван Левенгука в 17 веке, начался описательный этап развития микробиологии. С тех пор методы визуализации непрерывно совершенствовались и, на сегодняшний день, у исследователей имеется целый арсенал всевозможного микроскопического инструментария, являющегося, однако, разнообразными двух видов микроскопов – оптического и электронного. В микробиологии оптическая 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 годы XX века. Однако электронная микроскопия, до настоящего времени являющаяся единственным методом визуализации нанометрового разрешения, имеет целый ряд недостатков, главных из которых – сложность приготовления препаратов и необходимость проведения исследований в условиях высокого вакуума.

В 1981 году был изобретен сканирующий зондовый микроскоп, в основе работы которого лежит регистрация взаимодействия, возникающего между сенсором (зондом) и поверхностью образца при сканировании. Результатом сканирования является цифровое трехмерное изображение поверхности изучаемых структур с нанометровым латеральным и пространственным разрешением. В настоящее время существует целое семейство зондовых микроскопов, один из которых – атомно-силовой микроскоп (АСМ), наиболее активно используется для изучения биообразцов микронного и субмикронного уровня организации благодаря простой процедуре пробоподготовки и возможности визуализации объектов практически в любой среде исследования [4].

Целью настоящей работы является проведение сравнительной морфометрии микроорганизмов методом контактной атомно-силовой микроскопии. Задачами работы являются: установление

оптимального метода пробоподготовки, изучение интактных клеток, а также клеток, подверженных воздействию солей тяжелых металлов.

При проведении эксперимента были использованы пробиотические штаммы бактерий *Bacillus subtilis*. Бациллы – обширный род грамположительных палочковидных бактерий, часто используемые в качестве модельных микроорганизмов [7]. В качестве регулирующего фактора использовалась водорастворимая соль сульфата кадмия  $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ . Влияние тяжелых металлов на микроорганизмы достаточно хорошо изучено [6]. Так, изменение функционирования клеток при воздействии тяжелых металлов ведёт к появлению морфологических аномалий микроорганизмов, что часто выражается в изменении их формы и размеров [5]. В частности, в присутствии ионов  $\text{Cd}^{2+}$  снижалось отношение площади поверхности к объёму, в результате чего клетки становились более удлинёнными [3].

Определение степени влияния металлов на морфологию клеток бактерий осуществлялось с помощью атомно-силового микроскопа СММ-2000 (ЗАО «ПРОТОН-МИЭТ», Россия) в контактном режиме с использованием кантиллеров общего назначения MSCT (Bruker, США), жесткостью 0.01 Н/м и номинальным радиусом кривизны зонда 15 нм. Опытным путем были подобраны оптимальные параметры сканирования клеточных образцов: скорость сканирования от 1 до 3 строк в секунду, задержка между измерениями – порядка 10–20 мс. Количественный морфометрический анализ полученных изображений проводили с использованием штатного программного обеспечения микроскопа.

Для получения АСМ образцов использовалась следующая последовательность пробоподготовки, которая также была подобрана опытным путем. Бактерии микроорганизмов инкубировались в жидкой питательной среде с минимально-подавляющей концентрацией соли металла в течение 36 часов при 37 °С в термостатируемом шкафу. Затем клетки отмывались от остатков питательной среды и неаккумулированных солей тяжелых металлов с помощью центрифугирования (1300 g; 10 мин.; 25 °С). Полученную водную суспензию клеток раскапывали на свежий скол слюды, выполняющей роль подложки.

На рисунке 1 показаны характерные изображения интактных клеток, полученные с помощью АСМ. Видно, что клетки имеют вид прямых или слабоизогнутых палочек с параллельными сторонами и округлыми концами.

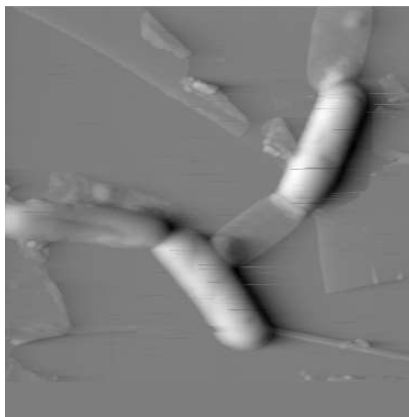


Рисунок 1. АСМ изображение intactных клеток *B. subtilis*  
Источник: изображение получено авторами

Изображения клеток, инкубированных в присутствии солей кадмия, показаны на рисунке 2. Микроорганизмы опытной группы визуально не отличаются от intactных, либо имеют изменения

клеточной стенки, выражающиеся в уменьшении длины и высоты при одновременном увеличении ширины клетки.

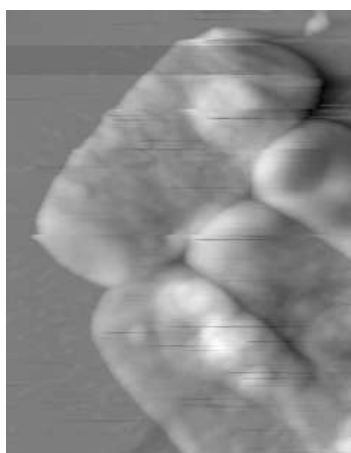


Рисунок 2. *B. Subtilis*, инкубированные в присутствии солей кадмия  
Источник: изображение получено авторами

Для обнаружения различий в контрольной и опытной группах образцов нами был проведен сравнительный количественный анализ морфологических параметров изучаемых бактериальных

клеток. Количественные данные были получены путем построения профилей клеток по линии и шероховатости по площади поверхности. Типичный профиль поверхности показан на рисунке 3.

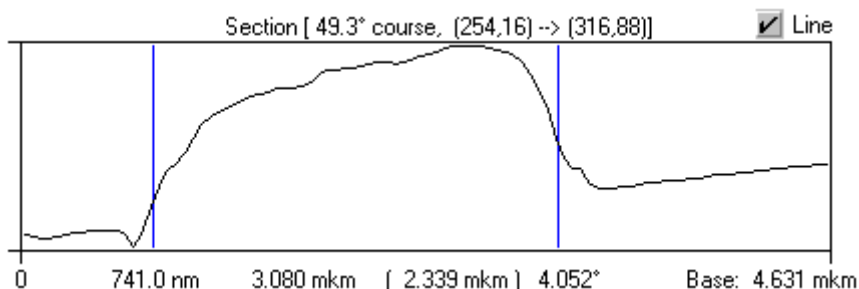


Рисунок 3. Профиль поверхности клеточной стенки *Bacillus subtilis*  
Источник: изображение получено авторами

Средние значения и среднеквадратические отклонения измеренных морфологических параметров, включающих в себя ширину, длину, высоту

и шероховатость клеточной стенки, представлены в таблице 1.

Таблица 1. Значения морфологических параметров изучаемых клеток

Параметр	Контроль	Опыт
Ширина, нм	575,23 ± 17,34	884,44 ± 10,52
Длина, мкм	3,89 ± 0,12	1,89 ± 0,11
Высота, нм	661,19 ± 19,51	458,89 ± 13,69
Шероховатость, нм	104,22 ± 1,61	30,43 ± 2,65

Источник: данные получены авторами

Для сравнения изучаемых групп образцов был использован непараметрический критерий Манна-Уитни, наиболее часто применяемый для оценки различий между двумя независимыми и несвязанными выборками по уровню какого-либо признака, измеренного количественно, например, для обнаружения различий в средних значениях двух генеральных совокупностей [2]. Нулевой гипотезой данного теста является предположение, что обе выборки были взяты из популяции с одинаковым распределением и, следовательно, с одинаковыми средними значениями. Если после расчета критерия значимости для двух или более выборок нулевая гипотеза отклоняется, это указывает на наличие свидетельств, позволяющих предположить, что выборки были взяты из разных групп, и, в свою очередь, различие между средними значениями оценивается как значительное.

С помощью общедоступного профессионального статистического пакета AtteStat [1] был установлен уровень значимости  $p < 0,05$ , указывающий на то, что отклонения от среднего результата являются значимыми, различия между выборками – статистически значимыми, следовательно, все морфометрические параметры двух групп микроорганизмов (интактных и после воздействия) имеют существенные различия.

Таким образом, в ходе выполненной работы установлен оптимальный метод подготовки клеточных образцов для изучения, методом АСМ изучены интактные и подверженные действию солей клетки *Bacillus subtilis*, проведен сравнительный анализ морфологических параметров клеток и показано статистически значимое различие по изучаемым параметрам (ширины, длины, высоты и шероховатости).

### Литература

1. Гайдышев И. Моделирование стохастических и детерминированных систем: Руководство пользователя программы AtteStat. – Курган, 2015. – 484 с. – URL: [http://биостатистика.рф/files/AtteStat\\_Manual\\_15.pdf](http://биостатистика.рф/files/AtteStat_Manual_15.pdf) (дата обращения: 12.04.2021).
2. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях – Л.: Медицина, 1973. – 144 с.
3. Комплексная оценка состояния цианобактерий *Nostoc paludosum* Kutz при воздействии различных поллютантов / С. Ю. Огородникова [и др.] // Теоретическая и прикладная экология. – 2010. – № 3. – С. 47–52.
4. Никиян А. Н., Татлыбаева Е. Б. Успехи и перспективы развития атомно-силовой микроскопии в микробиологии // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2014. – № 6. – С. 112–117.
5. Тяжелые металлы как фактор антропогенного воздействия на почвенную микробиоту / С. В. Левин [и др.] // Микроорганизмы и охрана почв. – 1989. – С. 5–14.
6. Тяжёлые металлы как фактор изменения метаболизма у микроорганизмов (обзор) / А. И. Фокина [и др.] // Теоретическая и прикладная экология. – 2015. – № 2. – С. 5–18.
7. Graumann P. *Bacillus: Cellular and Molecular Biology*. – Caister Academic Press, 2012. – 454 p.

Статья поступила в редакцию: 15.04.2021; принята в печать: 02.02.2022.

Авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.