

Изучение бактерий с помощью сканирующего зондового микроскопа. Сравнение различных режимов сканирования. Методики приготовления образцов для исследования на воздухе и в жидкости.

Так уж получилось, что одним из первых объектов, который я начала изучать с помощью СЗМ были бактерии. Бактерии имеют весьма «подходящий» размер для этого метода – около 1 микрона в диаметре, и длиной от одного до нескольких микрон. Сканеры с большим полем до 100 микрон были дороги, а потому редки, и бактериальные клетки лучше других клеток подходили для изучения на 14 микронном сканере, которым был оборудован наш СЗМ.

Методика приготовления образца с бактериями для изучения методом СЗМ на воздухе, совсем несложная и не требует специальной подготовки. Петлю из металлической проволоки прокалывают на огне, остужают, и аккуратно подцепляют колонию бактерий, которые предварительно вырастили на твердой питательной среде (бактерии были предоставлены микробиологами). Часть колонии бактерий помещают в стерильную пробирку с дистиллированной водой (или остывшей кипяченой). Концентрацию микроорганизмов определяли на глаз по мутности полученной суспензии (примерно 10^9 клеток в мл). Затем капаем несколько микролитров препарата на чистую подложку (проще всего использовать свежий скол слюды). Важно в случае с дистиллированной водой быстро накапать суспензию на подложку, чтобы клетки не успели разрушиться. После высыхания образец готов к просмотру.

Мне очень повезло тем, что представилась возможность «увидеть» бактерии с помощью разных приборов, работающих в различных режимах.

Изучение бактерий на воздухе было весьма увлекательным занятием. Я посмотрела огромное количество различных бактерий на микроскопе Nanoscope III a, и даже составила мини атлас СЗМ-изображений, но наблюдения мне на воздухе быстро наскучили, хотелось попробовать выйти на следующий уровень и получить чудесные изображения бактерий в жидкости.

Но, к сожалению, в жидкости особо остро встает проблема закрепления клеток на подложке. И уже через некоторое весьма непродолжительное время, все клетки были сметены из области просмотра.

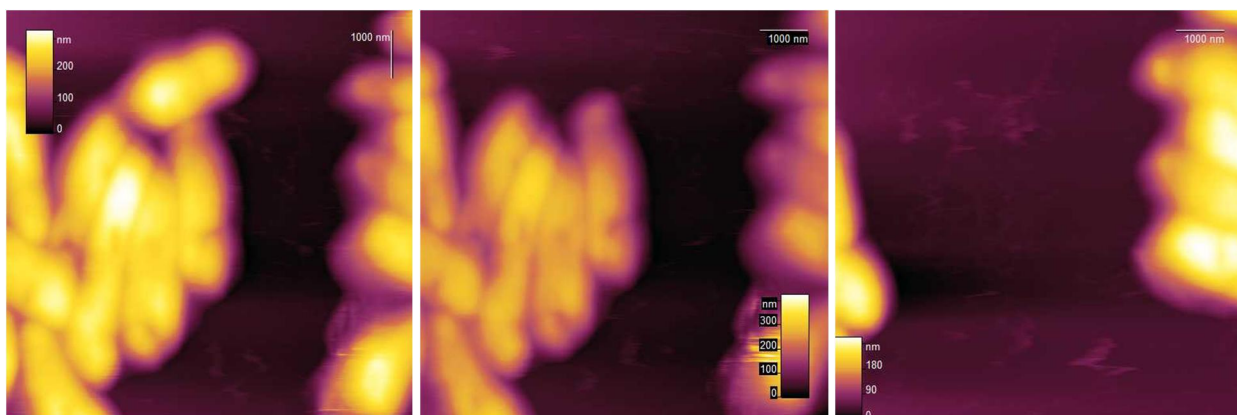


Рис. 1 Изображение бактерий, полученное на СЗМ Nanoscope IIIa в жидкой среде. С течением времени клетки сметаются сканирующей иглой. На серии рисунков продемонстрирована новая палитра программы «Фемтоскан Онлайн», и показаны новые возможности по расположению в компактном режиме просмотра масштабного отрезка и палитры.

Изучив литературу, я поняла, что универсальной методики закрепления клеток на поверхности подложки не существует. И я стала пробовать самые различные варианты. После того, как я попробовала модифицировать поверхность слюды полилизинном, мне наконец удалось получить вполне достойное АСМ- изображение кишечной палочки (рис. 2).

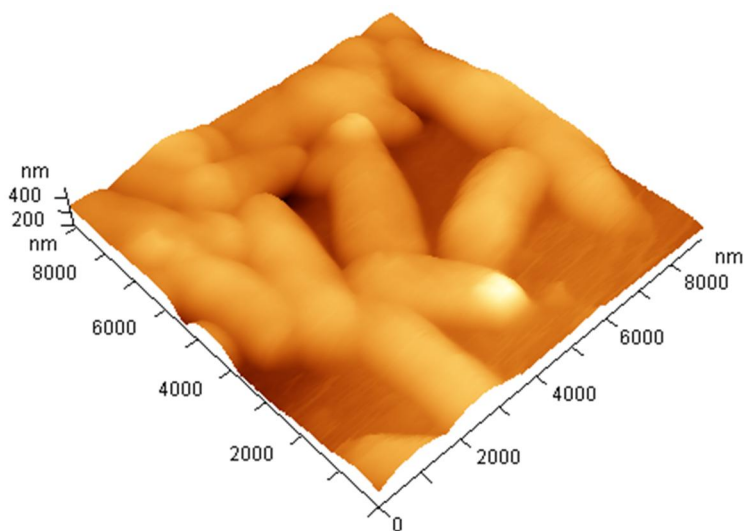


Рис. 2 Бактерии E.coli в жидкости.

Слюда модифицирована полилизинном.

Изображение получено в контактном режиме на СЗМ Nanoscope IIIa

На рисунке 3 показано изображение бактерии *Escherichia coli JM109*, полученное в режиме MAC (Magnetic Alternative Current Mode) на приборе компании Molecular Imaging в жидкости (жидкая питательная среда). Бактерии адсорбированы на поверхность слюды, модифицированной полилизинном.

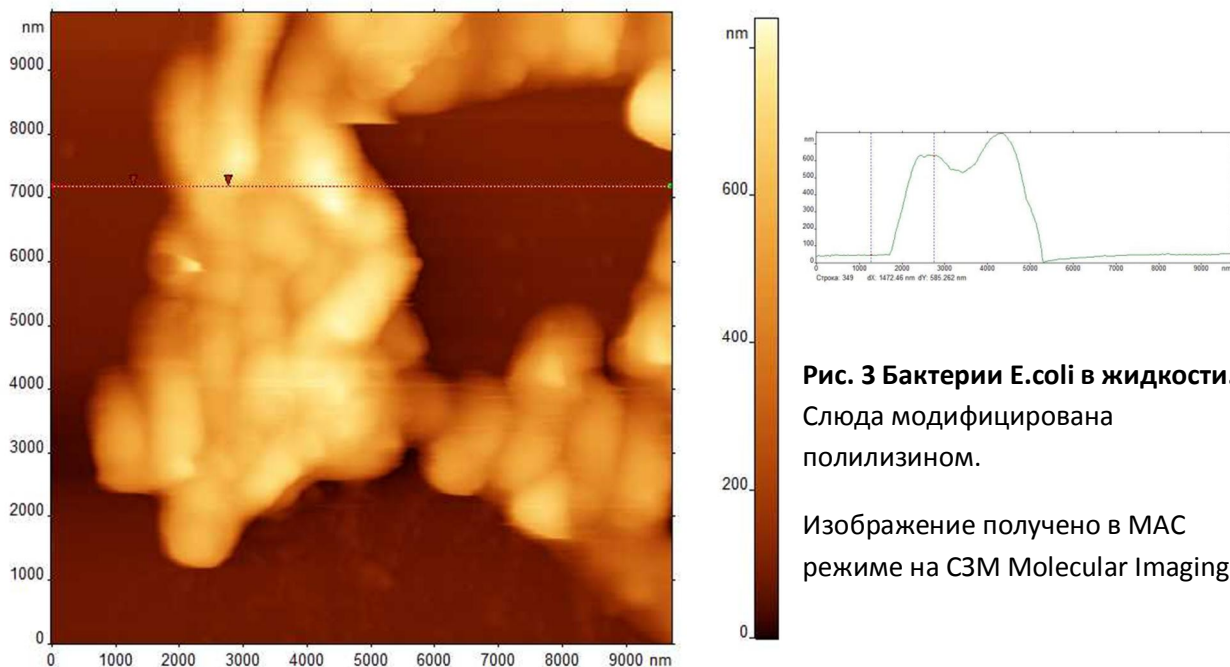


Рис. 3 Бактерии E.coli в жидкости.

Слюда модифицирована полилизинном.

Изображение получено в MAC режиме на СЗМ Molecular Imaging.

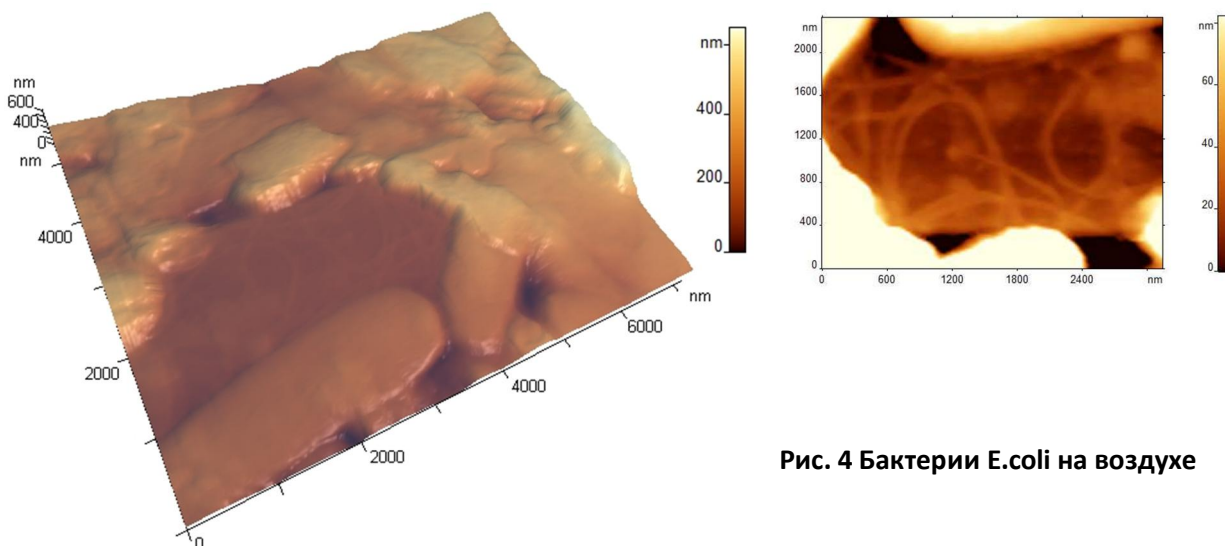
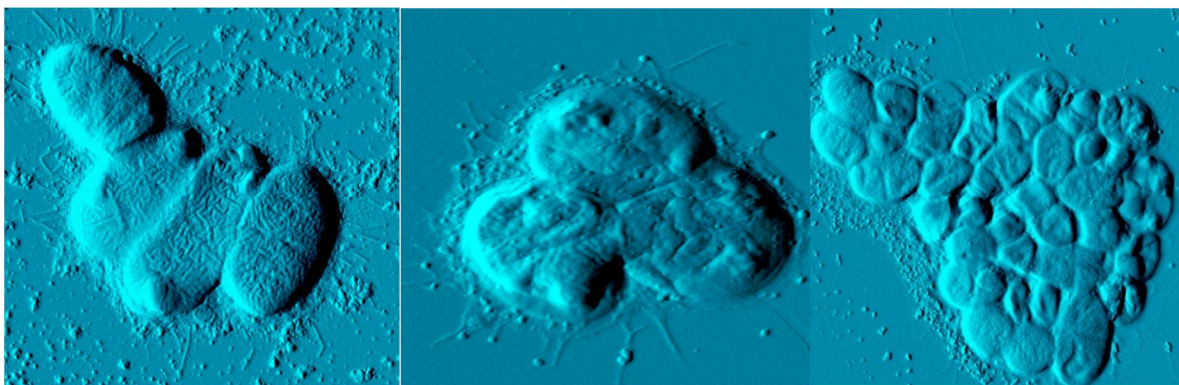


Рис. 4 Бактерии E.coli на воздухе

На рисунке 4 показаны те же самые бактерии. В этом случае изображение получено на воздухе на СЗМ Molecular Imaging в резонансном режиме сканирования. Бактериальные жгутики видны более отчетливо, по сравнению с изображением в жидкости.

И еще немного лирики.

В журнале «Химия и жизнь. XXI век», 2003 №4 сс. 16-19 была опубликована статья Садовского А.С. «Индиго нестареющий и невыцветающий...», для иллюстрации которой я подготовила изображения бактерий в синей цветовой палитре. В статье сообщалось об использовании бактерий для окрашивания хлопка.



Для подготовки публикации использовалась следующая литература:

1. Vorobyova E.A., Soina V.S., Mamukelashvili A.G., Bolshakova A., Yaminsky I.V., Mulyukin A.L. *Living Cells in Permafrost as Models for Astrobiology Research* // Chapter 19 in book "Life in Ancient Ice" (edited by J.D. Castello and S.O. Rogers. Published by Princeton university press. 2005. 308 p.) pp. 277-288
2. Bolshakova A.V., Kiselyova O.I., Yaminsky I.V. *Microbial Surfaces Investigated Using Atomic Force Microscopy* // Biotechnology progress, v. 20 (N6) 2004, pp.1615-1622
3. Bolshakova A.V., Vorobyova E.A., and Yaminsky I.V. *Indication of living bacterial cells in native soil and permafrost* // Phys. Low-Dim. Struct., 3/4, 105-112 (2003).
4. Bolshakova A.V., Kiselyova O.I., Filonov A.S., Frolova O.Yu., Lyubchenko Yu.L. and Yaminsky I.V. *Comparative studies of bacteria with atomic force microscopy operating in different modes* // Ultramicroscopy, 86 (1-2), 121-128 (2001).
5. А.В.Большакова, Е.А.Воробьева, А.С.Филонов, И.В.Яминский *Зондовая микроскопия почвенных бактерий Arthrobacter globiformis* //Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования №11, 2000 С. 76-78)