

## Оценка стабильности морфофункциональных свойств ризосферных штаммов *Bacillus subtilis* с помощью атомно-силовой микроскопии

© 2021. М. Н. Артамонова, к. б. н., доцент,  
Н. И. Потатуркина-Нестерова, д. м. н., профессор, Б. Б. Костишко, м. н. с.,  
Ульяновский государственный университет,  
432970, Россия, г. Ульяновск, ул. Льва Толстого, д. 42,  
e-mail: artamonovamn2013@yandex.ru

Метод атомно-силовой микроскопии (АСМ) обладает важным преимуществом – нетребовательностью к электропроводности исследуемых объектов, что позволяет изучать живые клетки без фиксации и с высоким разрешением. Предложено использовать высокоразрешающую АСМ для определения морфометрических и упруго-механических свойств маркерного вида *Bacillus subtilis*, выделенного из ризосферы сельскохозяйственной культуры *Cucurbita pepo* L. в динамике её роста. Указанные свойства микроорганизма-симбионта являются показателями функциональной активности и устойчивости к действию биотических и абиотических факторов окружающей среды. Показана стабильность линейных параметров (длина, ширина и высота) бацилл, выделенных в различные фазы развития растения, модуль упругости и показателя среднеквадратичной шероховатости поверхности ризосферных штаммов бацилл. Так, в фазе «всходы», «бутонизация», «цветение» и «плодоношение» растения модуль упругости бацилл составил 5,9; 5,8; 6,0 и 5,7 МПа соответственно; показатель среднеквадратичной шероховатости поверхности – 37,5; 35,1; 31,8 и 40,0 нм соответственно ( $p > 0,05$ ). АСМ-идентификация поверхности клеток *B. subtilis* выявило изменение адгезивной активности изучаемых штаммов. В фазы «всходы» и «бутонизация» данный показатель составил 32,0 и 41,0 нН соответственно, в фазе «цветение» и «плодоношение» значения силы адгезии достоверно увеличивались по сравнению с первыми фазами (73,0 и 69,0 нН соответственно;  $p < 0,05$ ).

Использование технологии атомно-силовой микроскопии показало её эффективность при исследовании стабильности морфометрических и упруго-механических свойств *B. subtilis*, являющихся отражением их функциональной активности растения-симбионта.

**Ключевые слова:** бактериально-растительный симбиоз, сканирующая зондовая микроскопия, сила адгезии бактериальных клеток, упруго-механические свойства бактерий, ризосферные бактерии.

## The stability assessment of the morphological and functional characteristics of rhizospheric strains of *Bacillus subtilis* using atomic force microscopy

© 2021. M. N. Artamonova ORCID: 0000-0002-1352-5274,  
N. I. Potaturkina-Nesterova ORCID: 0000-0002-0922-8314,  
B. B. Kostishko ORCID: 0000-0002-1112-0740,  
Ulyanovsk State University,  
42, L'va Tolstogo St., Ulyanovsk, Russia, 432970,  
e-mail: artamonovamn2013@yandex.ru

The important advantage of atomic force microscopy (AFM) is the low power requirements for the studied objects, which allows studying living cells without fixation and with high resolution. It was proposed to use AFM to determine the morphometric and elastic-mechanical characteristics of the marker specie *Bacillus subtilis* isolated from the rhizosphere of the *Cucurbita pepo* L. crop in different vegetative phase of plant development. These characteristics of the microorganism are indicators of their functional activity and resistance to the action of biotic and abiotic environmental factors. It was shown that some parameters (length, width and height, elastic modulus, and the root mean square roughness) of *B. subtilis* isolated at different phases of plant growth were stable. So, elastic modulus of the bacilli was equal to 5.9 in plant sprouting phase, 5.8 in the phase of budding, 6.0 in the phase of flowering, 5.7 MPa in the phase of fruiting of the plant. The indicator of the root mean square surface roughness was equal to 37.5 in plant sprouting phase; 35.1 in the phase of budding; 31.8 in the phase of flowering and 40.0 nm in the phase of fruiting of the plant. AFM study of the surface of *B. subtilis* cells revealed a change of the adhesion force of the studied strains. This indicator was equal to 32.0 and 41.0 nN

in plant sprouting and budding phases respectively. And the adhesion force was increasing significantly in the flowering and fruiting phase in comparison to the first phases (73.0 and 69.0 nN, respectively;  $p < 0.05$ ).

The use of atomic force microscopy technology has shown its effectiveness in studying of the stability of the morphometric and elastic-mechanical characteristics of *B. subtilis*, which are indicators of functional activity of the plant.

**Keywords:** bacterial-plant symbiosis, scanning probe microscopy, adhesion force of bacterial cells, elastic-mechanical characteristics, rhizospheric bacteria.

Создание туннельного микроскопа позволило осуществить принципиально новый метод микроскопических исследований – сканирующую зондовую микроскопию, основанную на силовом взаимодействии между наноразмерным кантилевером, располагающимся на конце упругой консоли микроскопа, и поверхностью исследуемого образца, действие которого обусловлено силами его упругости, адгезии, магнитными и электростатическими силами, что приводит к изгибу консоли. Регистрируя уровень изгиба, можно контролировать силу взаимодействия зонда с поверхностью объекта исследования [1]. Важным преимуществом данного метода явилась нетребовательность к электропроводности исследуемых объектов, что позволяет изучать живые клетки без фиксации и с высоким разрешением [2].

Преимуществом данного метода, в отличие от световой микроскопии, является возможность не просто визуализировать объект и получить трёхмерное изображение, но и проводить анализ таких важнейших общих интегральных показателей, как уровень упруго-механических (вязко-эластических) свойств, мобильность поверхностных слоёв, шероховатость (складчатость) и др., свидетельствующие о функциональной активности бактерий [3]. Перечисленные показатели отражают фундаментальные механические свойства микроорганизмов, их функциональность и устойчивость к действию биотических и абиотических факторов окружающей среды [4].

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) позволяет количественно оценить адгезивную активность микроорганизмов, которая, как известно, является начальным этапом формирования микробных сообществ. Прикрепление к поверхности корней и дальнейший рост в адгезированном состоянии являются факторами, оказывающими сильнейшее влияние на процессы жизнедеятельности микробов, оно делает возможным потребление нерастворимых субстратов, изменяет скорость метаболизма микроорганизмов, позволяет им создавать сложные микробные сообщества и, синтезируя определённые метаболиты, оказы-

вать существенное благоприятное воздействие на растение-симбионт. Известно, что жизнедеятельность и продуктивность растений во многом зависят от того, какие микробы и в каком количестве колонизируют поверхность и внутренние компартменты растения [5].

Метод АСМ позволяет получить представление о таких свойствах исследуемого объекта, как шероховатость поверхности клетки, показывающую отклонение рельефа от среднего значения; показателя упругости, характеризующего степень ригидности клеточной стенки и адгезивной активности клетки, определяющей силу её взаимодействия с биотическими или абиотическими поверхностями [6]. Однако, возможности АСМ-исследований микроорганизмов до сих пор использовались только для визуализации 3D изображений бактерий или для изучения упруго-механических и адгезивных свойств при взаимодействии бактериальных клеток с абиотическими поверхностями, например, с углеродными наноматериалами, представленными одно- и многостенными нанотрубками, нановолокнами и C60-фуллеренами [7]. До сих пор остаётся не изученным взаимодействие микроорганизмов с биологическими объектами, являющимися компонентами природных симбиотических систем.

Примером такого взаимодействия является симбиоз растений и их микробиоты. Онтогенез растений происходит при их тесном взаимодействии с микроорганизмами почвы, которые заселяют ризосферу и образуют ассоциацию: «микроорганизмы – корневая система растения». В этой связи большой интерес представляют ризосферные микроорганизмы, формирующие на корнях растений сложные по таксономическому составу и структурно-функциональной организации сообщества, оказывающие на растения полифункциональное воздействие [8].

Рядом работ, посвящённых изучению симбиотной микробиоты ризосферы технических, древесных и овощных культур, показано их влияние на продуктивность и урожайность растений [9–11]. Растение, стимулируя размножение микроорганизмов около своих корней, обеспечивает себе мощный дополни-

тельный фактор воздействия на почву, в результате чего образуются доступные питательные вещества, накапливаются различные физиологически активные и стимулирующие вещества, что улучшает условия питания растений и, следовательно, формируются условия для взаимовыгодного симбиоза [12].

Одним из наиболее активных продуцентов метаболитов, оказывающих положительное влияние на растения, являются бактерии вида *Bacillus subtilis* [13]. Показано, что ризосфера сельскохозяйственной культуры *C. pepo* L. представляет собой плотно заселённую нишу с высоким уровнем видового разнообразия и колонизационной плотности микроорганизмов, доминирующее положение среди которых занимает вид *B. subtilis* [14]. От морфофункциональных и механических свойств данных бактерий зависит их влияние на физиологическое состояние растения-симбионта, возможно, это воздействие изменяется в процессе роста растения. В связи с этим определение степени выраженности указанных свойств бактериального компонента может быть перспективным для разработки методов естественного воздействия на сельскохозяйственные растения. Однако анализ литературных данных показал, что исследование морфофункциональной активности ризобактерий, выделенных в различные стадии вегетации растения, не проводилось.

Целью исследования явилось проведение методом атомно-силовой микроскопии сравнительного анализа морфометрических и упруго-механических параметров штаммов *B. subtilis*, выделенных из микробного сообщества ризосферы *C. pepo* L. в динамике вегетационного развития растения-симбионта.

### Материалы и методы исследования

Объектом исследования явились штаммы *B. subtilis*, выделенные из ризосферы сельскохозяйственной культуры *C. pepo* L. сорта «Лечебная». Растения возделывали в условиях закрытого грунта в соответствии с нормами технологического проектирования тепличных комбинатов для выращивания овощей и рассады (НТП 10-95) в теплицах ООО «Поволжская Агро Компания» на территории Ульяновской области. Выделение бактерий из 240 проб ризопланы тыквы обыкновенной осуществляли по методу последовательных отмываний корней [15].

Морфологические и упруго-механические свойства ризосферных штаммов бактерий определяли в фазах «всходы», «бутонизация»,

«цветение» и «плодоношение». Морфометрические и упруго-механические параметры бактериальных клеток (длину, ширину, высоту, модуль упругости, среднееквадратичную шероховатость микро- и нанорельефа и силу адгезии) исследовали с помощью сканирующего зондового микроскопа Solver P47-PRO (NT-MDT, Россия). Микроскопию осуществляли в полуконтактном режиме, который позволяет визуализировать шероховатость и малоразмерные детали рельефа поверхности. При работе в полуконтактном режиме кантилевер колеблется на своей резонансной частоте. В нижнем полупериоде колебаний кантилевер касается поверхности образца. При этом происходит измерение амплитуды колебаний, которая в последующем используется в качестве начальной точки регистрации обратной связи при отталкивании кантилевера от поверхности образца. При поддержании постоянной амплитуды колебаний выстраивается топографическое изображение исследуемого объекта. В полуконтактном режиме АСМ происходит кратковременное взаимодействие острия кантилевера с поверхностью бактериальных клеток, поэтому повреждения исследуемого объекта в значительной мере исключаются [16].

Шероховатость или образование складок поверхностной мембраны увеличивает поверхность бактериальной клетки, что имеет существенное значение для её метаболизма. Для измерения шероховатости использовали модуль Юнга, выражающий зависимость между действующей на бактериальную клетку силой ( $F$ ) и глубиной продавливания. Силу адгезии определяли по отклонению консоли от поверхности исследуемой клетки [17].

Статистическую обработку данных производили с использованием программ Microsoft Excel и Statistica 6.0. Оценку статистической значимости полученных результатов осуществляли с помощью  $t$ -критерия Фишера-Стьюдента ( $p < 0,05$ ).

### Результаты и обсуждение

Анализ АСМ-изображений *B. subtilis* показал, что бактерии, выделенные из микробного сообщества ризосферы *C. pepo* L., во все изученные фазы роста бактерий, располагались преимущественно одиночно, имели типичную форму (рис. 1а, б). Линейные параметры бактерий в исследуемых образцах были однородными, средние значения размеров бактерий *B. subtilis* составили  $3,5 \pm 0,2$  в длину,  $2,4 \pm 0,1$  в ширину и  $1,9 \pm 0,1$  мкм в высоту.

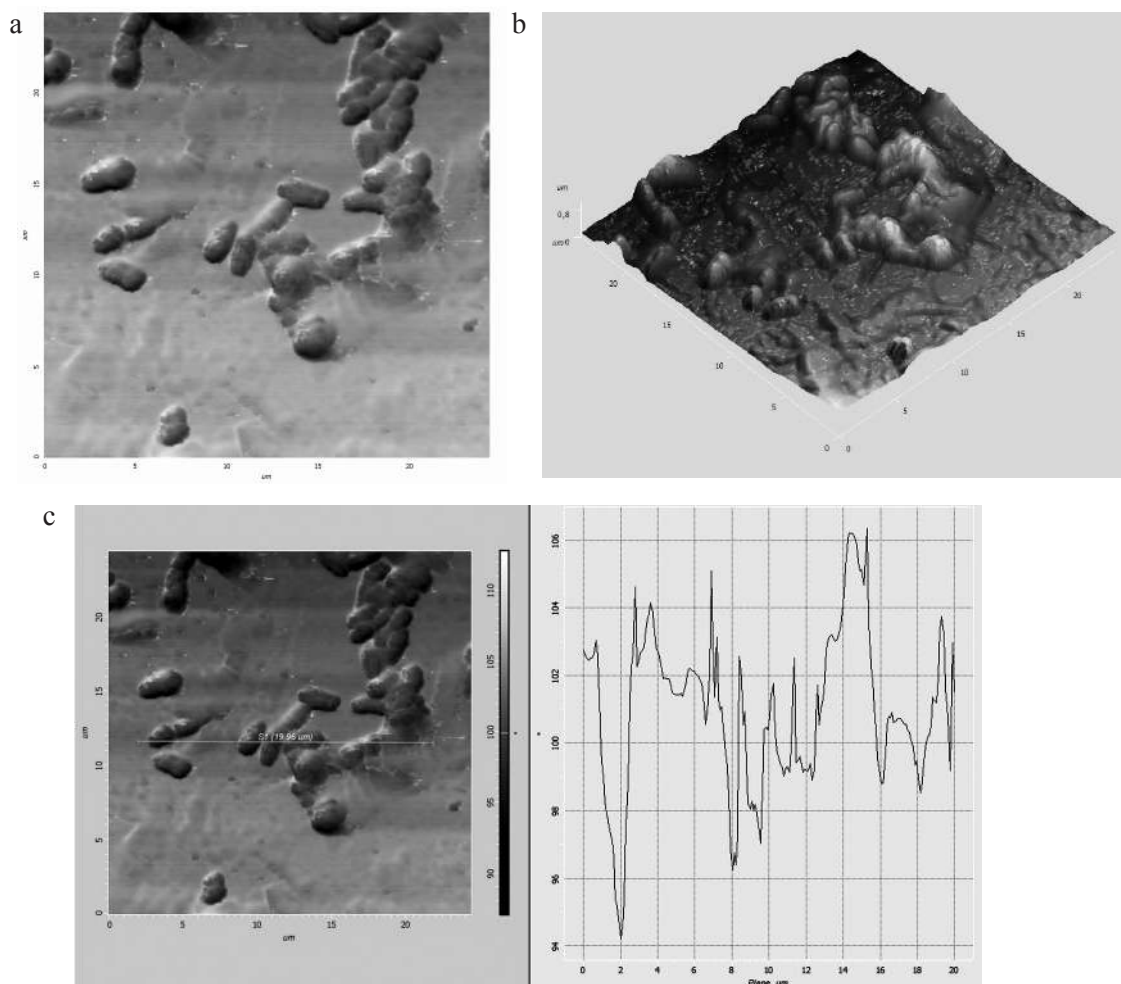
Результаты, полученные путём АСМ - идентификации поверхности живых микробных клеток *B. subtilis*, регистрации и анализа силовых кривых, показали стабильность упруго-механических свойств бактерий, выделенных из микробиоценоза ризосферы в различные периоды вегетации растения.

При АСМ-визуализации бацилл было установлено, что ультраструктура поверхности была относительно гладкой с малоразвитым рельефом, что является характерным признаком грамположительных бактерий и определяется особенностью строения клеточной стенки подобного типа (рис. 1).

Параметры среднеквадратичной шероховатости клеток *B. subtilis*, выделенных в различные периоды вегетации растения, не имели достоверных различий. В фазы «всходы»,

«бутонизация», «цветение» и «плодоношение» они составили  $37,5 \pm 0,6$ ;  $35,1 \pm 4,6$ ;  $31,8 \pm 2,8$  и  $40,0 \pm 2,1$  нм соответственно ( $p < 0,05$ ). Следовательно, данный показатель оставался стабильным на протяжении всех изученных фаз роста растения-симбионта.

Анализ упруго-механических свойств исследуемых штаммов показал, что уровень модуля упругости *B. subtilis*, выделенных из микробиоценоза ризосферы *C. pepo* L., также достоверно не изменялись в процессе вегетационного развития растения. Модуль упругости *B. subtilis* в фазе «всходы» составил  $5,9 \pm 0,2$ , в фазе «бутонизация» –  $5,8 \pm 0,1$ , в фазе «цветение» –  $6,0 \pm 0,3$  и фазе «плодоношение» –  $5,7 \pm 0,3$  МПа ( $p < 0,05$ ). Уровень значений среднеквадратичной шероховатости клеточной поверхности также свидетельствовал



**Рис. 1.** АСМ-изображение *B. subtilis*: а) полученное в полуконтактном режиме; б) 3D – изображение; в) профиль сечения на выбранном участке АСМ-скана, отображающий особенности топографии поверхности бактериальных клеток. Микробные клетки 10-часовой культуры *B. subtilis* адсорбированы на слюде. Размер скана:  $25 \times 25$  мкм

**Fig. 1.** AFM-image of *B. subtilis*: a) obtained in semi-contact mode; b) 3D-image; c) cross-sectional profile on the selected area of the AFM scan displaying the features of the surface topography of bacterial cells. Microbial cells of a 10-hour culture of *B. subtilis* are adsorbed on mica. Scan size is  $25 \times 25$   $\mu\text{m}$

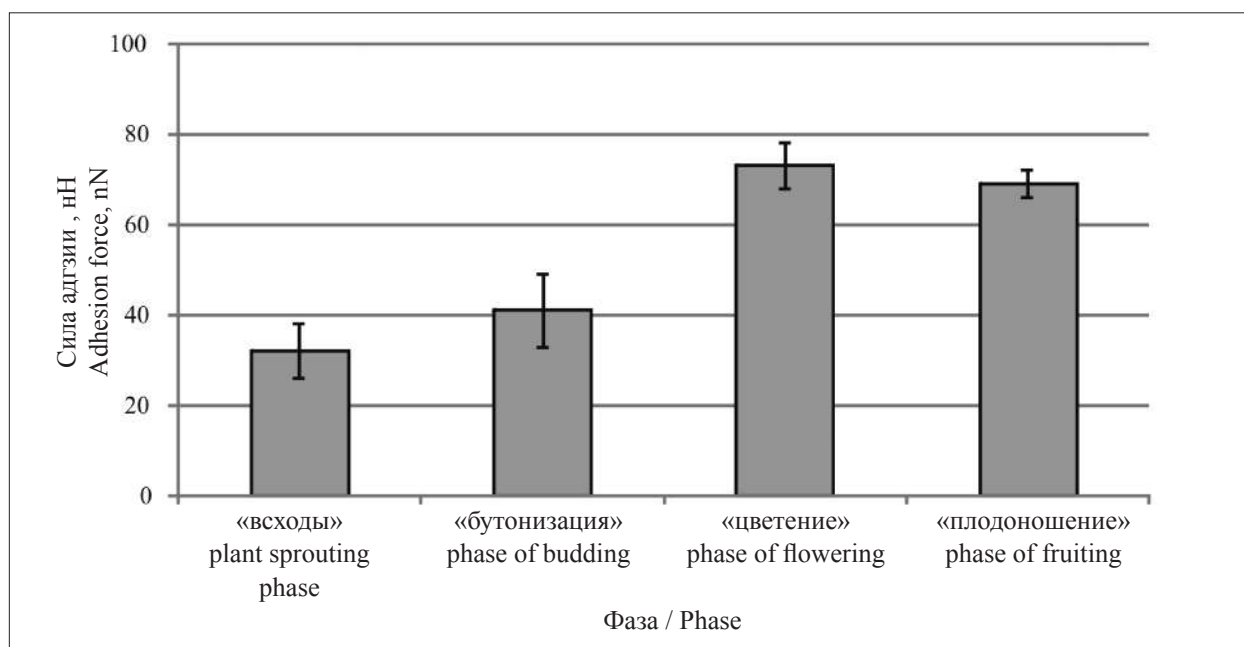


Рис. 2. Адгезивная активность *B. subtilis* в ходе вегетации *C. pepo* L.

Fig. 2. Adhesive activity of *B. subtilis* during different vegetative phase of plant development of *C. pepo* L.

о стабильности их упруго-механических свойств в ходе всех периодов вегетации растения.

Данные, полученные путём АСМ-идентификации поверхности клеток *B. subtilis*, регистрации и анализа силовых кривых, демонстрировали наращивание в процессе роста симбионта *C. pepo* L. адгезивной активности исследуемых штаммов (рис. 2).

На начальных этапах вегетации растения сила адгезии бактериальных клеток увеличивалась незначительно, в фазе «всходы» и «бутонизация» данный показатель составил  $32,0 \pm 6,0$  и  $41,0 \pm 8,0$  нН ( $p < 0,05$ ) соответственно. У штаммов *B. subtilis*, выделенных из микробиоценоза ризосферы *C. pepo* L. в фазе «цветение» и «плодоношение», значения силы адгезии достоверно увеличивались по сравнению с первыми фазами ( $73,0 \pm 5,0$  и  $69,0 \pm 3,0$  нН соответственно;  $p < 0,05$ ).

Работами ряда исследователей показано, что морфометрические и механические свойства, такие как упругость, вязкость и адгезивная активность являются одними из важнейших показателей структурно-функционального состояния бактерий [18]. Возможности АСМ не ограничиваются визуализацией объектов, метод позволяет исследовать их структурно-функциональное состояние. Установлено, что упруго-механические свойства бактерий обеспечивают их устойчивость к действию неблагоприятных факторов окружающей среды, таких как антибиотики, истощение питательной среды при длительном

культивировании. При действии этих факторов выявлены выраженная гетерогенность морфометрических показателей и дезорганизация поверхностных клеточных структур объекта исследования [19].

Известно, что шероховатость представляет собой совокупность неровностей, образующих микрорельеф поверхности и является причиной того, что истинная площадь поверхности бактерий выше, чем геометрическая. Количественная оценка клеточной шероховатости поверхности микробных клеток имеет важное практическое значение, так как позволяет выявить влияние микрорельефа поверхности на устойчивость бактерий к воздействию внешних неблагоприятных факторов [20].

В работе впервые на примере модельного вида *B. subtilis* с помощью АСМ показано, что линейные параметры, упругость и шероховатость поверхности исследуемых бактерий в процессе формирования микробного сообщества ризосферы были стабильны, что указывает на постоянство структурной целостности бактерий и сохранение их функциональной активности в динамике развития растения симбионта.

Одним из факторов, определяющих возможность влияния микроорганизмов на развитие растений, является их способность адгезироваться на поверхности корней растений. У штаммов *B. subtilis*, выделенных в ходе вегетации *C. pepo* L., выявлено динамическое увеличение адгезивной активности,

максимально проявлявшееся у бацилл, выделенных из микробиоценоза ризосферы в фазе «цветение» и «плодоношение» растения. Повышение силы адгезии бацилл в процессе роста *C. pero* L. способствует формированию взаимовыгодной растительно-микробной ассоциации с хозяином, что является одним из важных факторов ростостимулирующего влияния бацилл на растения. Видимо, в процессе развития растения происходит увеличение продукции растительных полисахаридов, что усиливает адгезию *B. subtilis* к корневой поверхности и способствует формированию и функционированию ризосферного комплекса.

Таким образом, использование технологии атомно-силовой микроскопии является эффективным инструментом исследования стабильности морфометрических и упруго-механических свойств *B. subtilis*, являющихся отражением их функциональной активности в процессе роста растения-симбионта.

## References

1. Parfenov V.A., Yudin I.A. Atomic force microscopy and its applications in science, technology and restoration // Izvestiya SPbGETU "LETI". 2015. No. 9. P. 61–70 (in Russian).
2. Potaturkina-Nesterova N.I., Artamonova M.N., Kostishko B.B., Pchelintseva E.S., Nesterov A.S. The study of nanomechanical properties of biomembranes using atomic force microscopy // Nanotechnologies in Russia. 2015. V. 10. No. 7–8. P. 105–108 (in Russian).
3. Zhurina M.V., Kostrikina N.A., Parshina E.Yu., Strelkova E.A., Yusipovich A.I., Maksimov G.V., Plakunov V.K. Visualization of the extracellular polymeric matrix of *Chromobacterium violaceum* biofilms by microscopic methods // Microbiology. 2013. V. 82. No. 4. P. 502–509 (in Russian). doi: 10.7868/S0026365613040162
4. Ivanchina N.V., Garipova S.R. Effect of plant growth promoting bacteria (PGPB) on the productivity and sustainability of plants // Eurasian Soil Science. 2012. No. 7. P. 87–95 (in Russian).
5. Antonyuk L.P. The communication in plant-bacterial symbioses: current status and prospects // The strategy of interaction of microorganisms and plants with the environment: materialy Vserossiyskoy konferentsii molodykh uchenykh. Saratov, 2010. P. 6 (in Russian).
6. Pleskova S.N. Nanotechnological AFM morphometry of bacterial cells // Fizika tverdogo tela. Vestnik Nizhegorodskogo universiteta im. N.I. Lobachevskogo. 2013. No. 2. P. 34–38 (in Russian).
7. Obratsova E.A., Lukashov E.P., Zarubina A.P., Parkhomenko I.M., Yaminskiy I.V. Bactericidal action of single-walled carbon nanotubes // Moscow University Physics Bulletin. 2009. No. 3. P. 81–84 (in Russian).
8. Ignatov V.V. The molecular basis of associative relationships of microorganisms with plants: scientific publication. Moskva: Nauka, 2005. 262 p. (in Russian).
9. Boronin A.M. Rhizosphere bacteria of the genus *Pseudomonas* contributing plant growth and development // Sorosovskiy obrazovatelnyy zhurnal. 1998. No. 10. P. 25–31 (in Russian).
10. Rashedul I.M. Characterization of plant growth-promoting traits of free-living diazotrophic bacteria and their inoculation effects on growth and nitrogen uptake of crop plants // J. Microbiol. Biotechnol. 2009. V. 19. P. 1213–1222. doi: 10.4014/jmb.0903.3028
11. Khairullin R.M., Burkhanova G.F., Sorokan A.V., Sarvarova E.R., Veselova S.V., Cherepanova E.A., Volgin S.G., Zamalieva F.F., Maksimov I.V. To the mechanisms of antiviral activity of *Bacillus* bacteria on potato plants // Theoretical and Applied Ecology. 2019. No. 4. P. 130–135 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2019-4-130-135
12. Feoktistova N.V., Mardanova A.M., Khadiyeva G.F., Sharipova M.R. Rhizospheric bacteria // Uchenyye zapiski Kazanskogo universiteta. Seriya: Estestvennyye nauki. 2016. No. 2. P. 207–224 (in Russian).
13. Melentyev A.I. Aerobic spore-forming bacteria *Bacillus* Coh. at agroecosystems. Moskva: Nauka, 2007. 147 p. (in Russian).
14. Artamonova M.N., Potaturkina-Nesterova N.I. Characterization of the microbial community of the rhizosphere and rhizoplanes *Cucurbita pepo* L. // Fundamentalnyye issledovaniya. 2013. No. 10. P. 3067–3070 (in Russian).
15. Tepper E.Z. Microbiology Workshop. Moskva: Drofa, 2004. 256 p. (in Russian).
16. Francis L W. Atomic force microscopy comes of age // Biol. Cell. 2009. V. 102. P. 133–143. doi: 10.1042/BC20090127
17. Tuson H.H., Auer G.K., Renner L.D., Hasebe M., Tropini C., Salick M., Crone W.C., Gopinathan A., Huang K.C., Weibel D.B. Measuring the stiffness of bacterial cells from growth rates in hydrogels of tunable elasticity // Molecular microbiology. 2012. V. 84. No. 5. P. 874–891. doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.08063.x
18. Vasilchenko A.S., Yarullina D.R., Nikiyan A.N., Teslya A.V. Morphological and functional characteristics of the bacteria *Bacillus cereus* at various stages of the life cycle // Vestnik OGU. 2012. No. 10. P. 66–71 (in Russian).
19. Deng Z., Lulevich V., Liu F.-T., Liu G. Applications of atomic force microscopy in biophysical of cells // J. Phys. Chem. B. 2011. V. 114. No. 18. P. 5971–5982. doi: 10.1021/jp9114546
20. Artamonova M.N., Potaturkina-Nesterova N.I. The study of the surface topography of *Bacillus subtilis* under hypothermia // Fundamentalnyye issledovaniya. 2014. No. 11–5. P. 1035–1039 (in Russian).