

УДК 543.427.4:579.22:576.08

АНАЛИЗ ХИМИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С МИКРОБНЫМИ СООБЩЕСТВАМИ, ОСНОВАННЫЙ НА КОРРЕЛЯЦИИ ОПТИЧЕСКИХ И РЕНТГЕНОВСКИХ ИЗОБРАЖЕНИЙ

© 2013 г. А. А. Легкодымов¹, А. В. Брянская², R. Simon³, В. Р. Альтапова³, В. И. Кондратьев¹,
М. Р. Машковцев¹, Т. Е. Алешина², Т. К. Малуп², Г. Н. Кулипанов¹, С. Е. Пельтек²

E-mail: a_legkodymov@mail.ru

Методом микро-РФА-СИ проанализировано распределение химических элементов для микробных сообществ различных гидротермальных экосистем (Курило-Камчатский вулканический пояс, Байкальская рифтовая зона) и ряда лабораторных культур. Описаны различные методики для проведения корреляции оптических и микро-РФА-СИ рентгеновских изображений клеток микроорганизмов. По совмещенным изображениям показано накопление химических элементов в клетках бактерий, цианобактерий, диатомовых и зеленых водорослях.

DOI: 10.7868/S0367676513090287

ВВЕДЕНИЕ

Места выхода геотермальных вод на земную поверхность характеризуются интенсивным развитием микробных сообществ. Основные факторы среды обитания микроорганизмов в таких системах: температура, крайние значения рН, анаэробизм, поступление вулканогенных веществ. Недавние исследования некоторых щелочных термальных источников Байкальской рифтовой зоны позволили установить особенности распределения микроэлементов в микробных сообществах [1, 2]. Применение сканирующей электронной микроскопии (SEM), просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) и РФА с использованием синхротронного излучения (СЦСТИ ИЯФ, Новосибирск) позволило установить точное распределение элементов: Ge, Mo, W, Li, Cs, Rb, Sr, Ba, Mn и т.д. Авторы установили, что микробные маты играют решающую роль в накоплении различных химических элементов, которые по-разному распределяются между органическими и минеральными веществами микробных матов. Так, распределение K, Mn, Ni, Cu, Zn, Fe является нормальным; Ca, Rb, Sr почти полностью связаны с минеральной частью, в то время как Ga, Ge и Vg накапливаются органическим веществом матов.

Не менее важно и интересно недавно проведенное исследование накопления и распределения элементов в микробных сообществах термальных источников Курило-Камчатского вулканического пояса [3]. Авторами были получены первые данные по содержанию элементов в микробных пленках термальных источников Долины гейзеров и кальдеры Узон. Было показано, что в микроэлементном составе преобладают щелочные и щелочно-земельные элементы (Li, Rb, Cs, Sr). Установлены значительные содержания аниогенных элементов (Mo, Sb, P, Ge). Особенно высоки содержания As, как в среде обитания микроорганизмов, так и в веществе микробных матов, что не может не обратить на себя внимание в свете недавних сообщений, касающихся способности микроорганизмов существовать при отсутствии фосфора, замещая его мышьяком в биомолекулах, включая ДНК [4]. Также в микробном сообществе кальдеры Узон обнаружено содержание Hg >500 млн⁻¹ [3]. Устойчивость микроорганизмов одновременно к совокупности ряда экстремальных факторов (температура, рН, высокие концентрации тяжелых металлов) свидетельствует об их большом биотехнологическом потенциале. Несомненно, что изучение и выделение такого ценного генетического материала востребовано различными областями нано- и биотехнологии, экологии и медицины.

В настоящее время во многих центрах синхротронного излучения в нашей стране и за рубежом проводятся эксперименты по изучению микробных сообществ и отдельных микроорганизмов [5, 6]. Эти современные работы актуальны и интересны

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт ядерной физики им. Г.И. Будкера Сибирского отделения Российской академии наук (ИЯФ СО РАН), Новосибирск.

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск.

³ Karlsruhe Institute of Technology, Laboratory for Application of Synchrotron radiation, Karlsruhe, Germany.

с научной точки зрения, так как микроорганизмы исследуются в качестве основы для новых биотехнологий (пищевая промышленность, биоэнергетика и т.д.).

Цель нашей работы – изучение распределения химических элементов в микробном сообществе (минеральная часть и органическое вещество (бактерии, цианобактерии, диатомовые и зеленые водоросли)) методом микро-РФА-СИ и сопоставление с данными, полученными оптическими методами.

МАТЕРИАЛЫ

В Институте ядерной физики (ИЯФ СО РАН, г. Новосибирск) совместно с Институтом цитологии и генетики (ИЦИГ СО РАН, Новосибирск) были проведены исследования элементного состава микробных сообществ. Образцы микробных сообществ были изучены с помощью оптической спектроскопии с целью получения оптических изображений биологических объектов (карт) и далее по известным оптическим картам был проведен микроэлементный анализ на сканирующем электронном микроскопе (SEM) с использованием энергодисперсионного детектора (Hitachi S-3400V, Oxford Instruments, INCAx-act) в Сибирском центре синхротронного и терагерцевого излучения (СЦСТИ ИЯФ СО РАН). Применение SEM в ИЯФ позволило определить легкие элементы ($Z < 15$). Далее на синхротроне АНКА (Германия, г. Карлсруэ) были выполнены эксперименты по исследованию распределения химических элементов микроорганизмов на бимлайне ANKA-FLUO [7-9]. Использование фокусирующего монохроматического пучка СИ в моде микро-РФА, позволило увеличить относительный порог обнаружения “тяжелых” элементов ($Z > 15$) как минимум на два порядка по сравнению с SEM и получить двухмерные карты распределения химических элементов в живых объектах с микронным разрешением. Далее было проведено совмещение оптических и микро-РФА-СИ рентгеновских изображений.

Для проведения процедуры анализа химических элементов в микробных сообществах на начальном этапе были проведены полевые работы по отбору образцов микробных сообществ, развивающихся в условиях высокого содержания таких элементов, как As, Hg, Fe, Ge, S и др. География исследуемых образцов включала Байкальскую рифтовую зону и Курило-Камчатский вулканический пояс, поскольку именно в условиях повышенной вулканической активности имеются выходы на поверхность вулканических флюидов, содержащих повышенные концентрации различных элементов. На начальном этапе были использованы образцы микробных сообществ источника За-

варзина (У-1), источника Термофильный (У-5), источника Строматолитовый и др. (Курило-Камчатский вулканический пояс) и источника Гарга (Баргузинская долина).

Пробы отбирались по руслу термальных ручьев в стерильные емкости. На изучаемых объектах отбирали пробы воды, донных осадков и микробных матов. Часть проб фиксировали 4% формалином или 96% этанолом. Часть проб поддерживали в живом состоянии.

Кроме природных образцов в данном эксперименте были использованы три штамма, выделенные из исследуемых зон, для которых на электронном микроскопе с энергодисперсионным детектором (СЦСТИ ИЯФ СО РАН) было показано накопление различных элементов из окружающей среды. Этим же методом проводилась предварительная оценка содержания элементов в природных образцах. Было обнаружено, что диатомовые водоросли, характерный размер которых составляет 10–20 мкм, накапливают Br, P, Cl, S, Mn, Fe с концентрациями на уровне 0.1–0.5 вес. %, бактерии и цианобактерии (размер 1–2 мкм) накапливают Cl, P, S, Cr, Fe на уровне 0.1–0.5 вес. %. Минимальный предел обнаружения химических элементов у электронного микроскопа с энергодисперсионным детектором находился на уровне 0.1–0.05 вес. %, а для химических элементов с $Z > 15$ резко уменьшался. Концентрации химических элементов в микроорганизмах ниже этого предела не могут быть определены с помощью электронного микроскопа. Для их определения использовался монохроматический пучок СИ в моде микро-РФА-СИ на бимлайне ANKA-FLUO (Германия, Карлсруэ), это позволило снизить минимальный предел обнаружения до 10^{-3} – 10^{-5} вес. %.

МЕТОДИКИ

Методика получения оптических изображений

Морфотипы бактерий, а также состав и количество клеток в контрольных и гибридных образцах изучали с помощью световых и люминесцентных микроскопов фирмы Karl Zeiss (Axio Imager M1 и Axioskop 2 Plus, Германия) Межинститутского центра коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН (ИЦИГ СО РАН, г. Новосибирск).

Для визуализации микроорганизмов в образцах необходимо было получить изображения, используя объективы $\times 100$ или $\times 63$, что невозможно сделать без иммерсии, поэтому в нашу задачу входил подбор оптически прозрачной органической пленки, которая могла бы заменить покровное стекло. Для анализа бактерий методом микро-РФА-СИ покровное стекло недопустимо, его не-

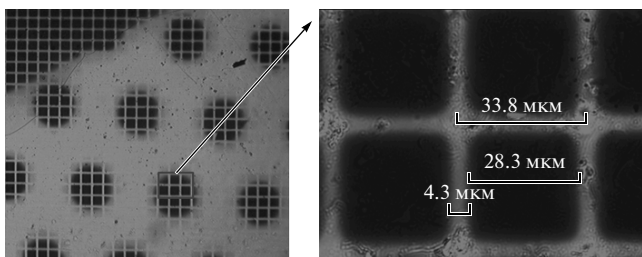


Рис. 1. Координатная сетка из золота на каптоне. Толщина каптона 12.5 мкм, толщина золота 50 нм, белый цвет – каптон, черный цвет – золото, диаметр круга – 125 мкм.

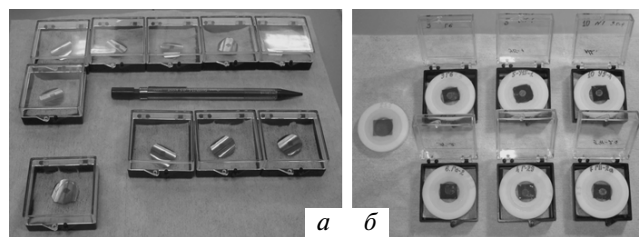


Рис. 2. *а* – каптоновые пленки после напыления золота; *б* – фотографии образцов с микроорганизмами.

обходимо убирать, а это в свою очередь приводит к смещению объектов исследования и не позволяет создать точную оптическую карту расположения микроорганизмов. В качестве такой пленки была использована органическая майларовая пленка с микропримесями Zn, толщина которой составляла 5 мкм. Обработку изображений проводили в программах MetaSystems ISIS и AxioVision Rel.4.8.

Методика проведения FISH. Для визуального разделения минеральной и органической части и лучшего выявления клеток микроорганизмов был применен метод флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH). Гибридизацию проводили при условиях, описанных в стандартных протоколах [11]. Зонды, меченные флуоресцентной меткой CY-5 и FAM, синтезированы фирмой МЕДИГЕН (Новосибирск). Реакцию проводили со всеми зондами одновременно. Для контроля гибридизации использовали краситель DAPI, который связывается с органической частью образца [12].

Методика получения оптических изображений на различных органических подложках (оргстекло, майлар, каптон и др.). Поскольку использование стандартных предметных стекол в качестве подложек невозможно для проведения рентгенофлуоресцентного анализа химических элементов в микроорганизмах, был проведен подбор и исследование свойств различных подложек: оргстекло, кварц, сапфир, майлар, каптон и др. Исследуемые подложки имели различные физико-химические и оптические свойства (толщина, прочность, оптическая прозрачность, автофлуоресценция и др.), а также содержали включения различных химических элементов (например, майлар содержал Zn, сапфир – Al, кварц – Si). Проведенные исследования показали, что большинство подложек имеют автофлуоресценцию, что делает затруднительным, а в некоторых случаях невозможным получение качественных и информативных оптических изображений биологических объектов в отраженном свете. Минимальный предел обнаружения химических элементов пропорцио-

нален отношению характеристического пика элемента к фону. Фон в свою очередь напрямую зависит от толщины подложки (комptonовское, упругое, тормозное рассеяние). Для максимально возможного предела обнаружения элементов необходимо, чтобы толщина подложки, на которой находятся микроорганизмы, была сравнима с размерами самих микроорганизмов. В качестве подложки была выбрана полиамидная пленка – Каптон фирмы DU-PONT – толщиной 12.5 мкм.

Методика нанесения координатных меток на каптон. На каптон магнетронным напылением была нанесена координатная сетка из золота толщиной 50 нм (рис. 1). Сетка использовалась для быстрого нахождения микроорганизмов на образце. Перед нанесением золота каптоновая пленка тщательно промывалась и прогревалась до 200°C, далее проводилось ионное травление в аргоновой плазме. На рис. 2 показаны каптоновые пленки после напыления золота и фотографии образцов с микроорганизмами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

На станции ANKA-FLUO были получены двумерные карты распределения химических элементов микроорганизмов с микронным разрешением. На рис. 3 показана схема эксперимента. В эксперименте использовалась энергия монохроматического излучения 20 кэВ. Энергетическое разрешение монохроматора $2 \cdot 10^{-2}$, источник излучения – поворотный магнит с $E_{\text{крит}} = 6$ кэВ. Размер монохроматического рентгеновского пучка составлял 5.7 мкм по горизонтали и 2.8 мкм по вертикали. В качестве фокусирующей рентгеновской оптики использовались параболические скрещенные составные рефракционные линзы (parabolic crossed component refraction lenses) [10]. Поток фотонов на энергии 20 кэВ составлял более 10^8 фотонов на мм^2 . Область сканирования составляла 100 мкм по горизонтали и 100 мкм по вертикали с захватом золотых меток для совмещения рентгеновских и оптических изображений. Шаг по вертикали составлял 2.5 мкм и 5 мкм по горизонтали

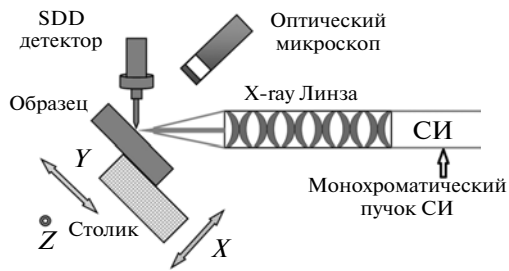


Рис. 3. Схема эксперимента на бимлайне ANKA-FLUO (Германия, Карлсруэ).

(обычно 40×20 точек), время сканирования в каждой точке составляло от 5 до 10 с. Каждый шаг (точка сканирования) содержал спектр РФА-СИ. Одна карта состояла из 800–1200 рентгеновских спектров РФА-СИ. На рис. 4 показаны два спектра РФА-СИ. По вертикальной оси – счет фотонов, по горизонтальной – энергия фотонов в эВ. Время измерения спектров 10 с. По спектрам РФА-СИ (рис. 4) можно оценить общую загрузку детектора. Было исследовано более 30 карт (оптических изображений) биологических образцов.

Обработка рентгеновских спектров РФА-СИ проводилась с помощью программы AXIL, Румса и MatLab. Концентрация элементов рассчитывалась по методу фундаментальных параметров программой Румса. На рис. 5 показаны распределения химических элементов одной карты с микроорганизмами. По вертикальной и горизонтальной оси отложены шаги. Вертикальная шкала справа – концентрация элементов (единица соответствует 100%). Совмещение оптических и рентгеновских изображений проводилось по золотым меткам. Ширина линии сетки порядка 4 мкм, она имеет резкий контраст на рентгеновской элементной карте. Это означает, что максимальная ошибка путем наложения двух карт (оптической

и рентгеновской) составит не более половины ширины линии сетки, что сравнимо и даже меньше одного шага сканирования. По совмещенным изображениям можно проводить элементный анализ микроорганизмов. На рис. 6 показано совмещение оптической и рентгеновской карт, а стрелкой – накопление As, Mn, Fe, Hg, совпадающее с местоположением клетки цианобактерии (предположительно *Phormidium* sp.) в источнике Термофильный У-5.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Отработана методика получения изображений микробиологических объектов с заданными координатами в оптической и рентгеновской областях. Отработаны различные методики для определения элементного состава микроорганизмов с помощью микро РФА-СИ. Получены двухмерные карты распределения химических элементов микроорганизмов с микронным разрешением. Сделано совмещение оптических и рентгеновских изображений (карт). Получены совмещенные изображения для природных микробных сообществ Курило-Камчатского вулканического пояса (источник Термофильный, источник Заварзина), Байкальской рифтовой зоны (источник Гаргинский) и ряда лабораторных культур коллекции микроорганизмов ИЦиГ СО РАН. Проведен анализ совмещенных изображений. Определено, что микроорганизмы накапливают As, Hg, Ge, Fe, Mn, Cu, Ca, Co, Sr и Ge. Отработанная методика позволяет проводить элементный анализ различных природных образцов (лабораторных культур), оценивать содержание ряда элементов в пробе, отслеживать закономерности накопления/биоаккумуляции элементов сообществом микроорганизмов, устанавливать вероятностные связи элемента с биологическим образцом.

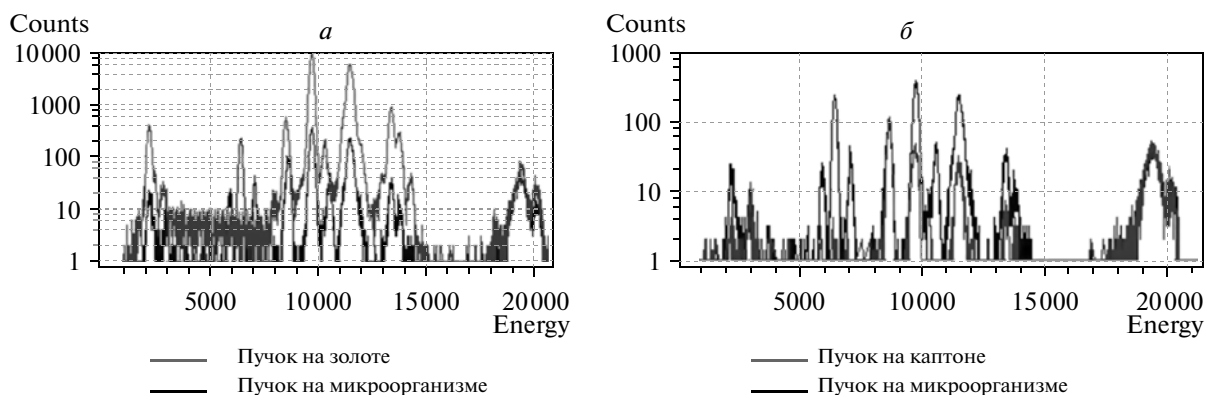


Рис. 4. а – спектр РФА-СИ от золотой метки и микроорганизма; б – спектр РФА-СИ от каптона и микроорганизма.

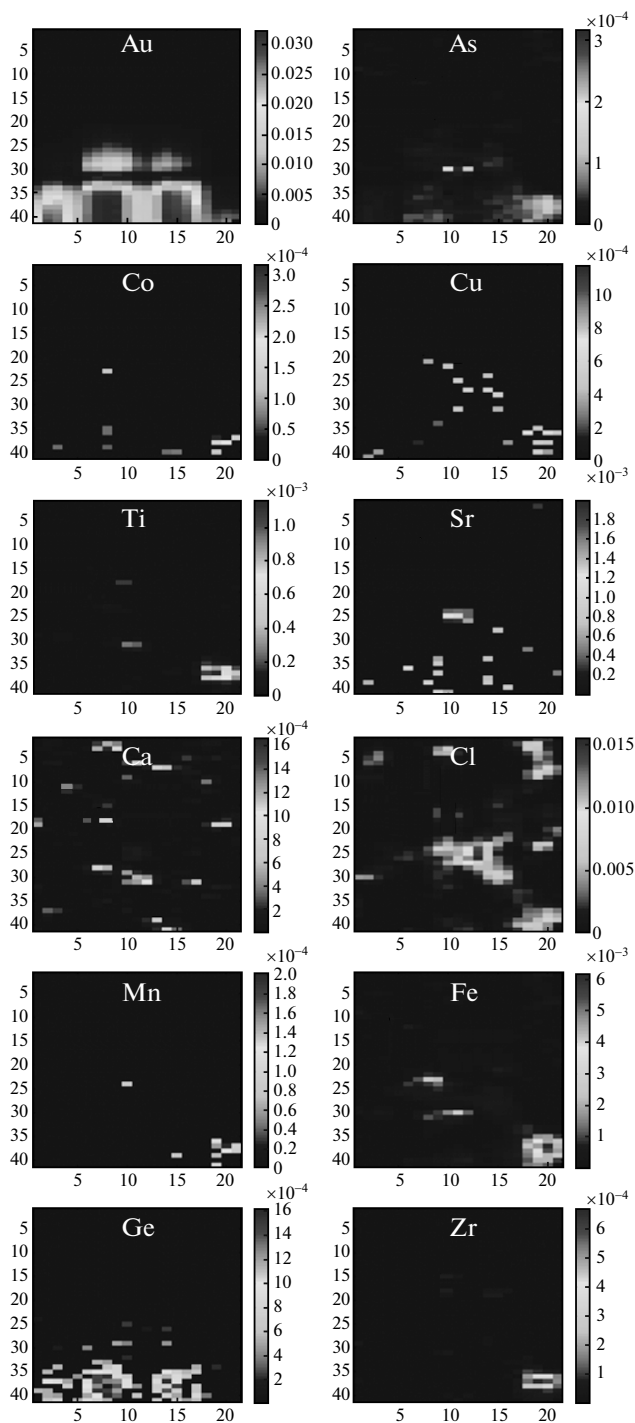


Рис. 5. Распределения химических элементов одной рентгеновской карты с микроорганизмами (размер карты – 100 × 100 мкм).

Работа выполнена при использовании оборудования ЦКП СЦСТИ и Межинститутского центра коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН, при финансовой поддержке Минобрнауки России, Инте-

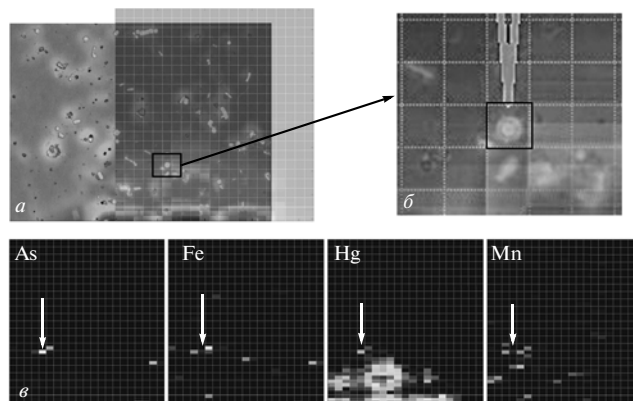


Рис. 6. *a* – совмещение оптической и рентгеновской карт (размер рентгеновской карты – 100 × 100 мкм); *б* – увеличение совмещенных карт, стрелкой показана цианобактерия (размер квадрата окружающего цианобактерию составляет 5 × 5 мкм); *в* – распределения химических элементов, стрелкой показано накопление As, Mn, Fe, Hg, совпадающее с местоположением клетки цианобактерии (размер карты – 100 × 100 мкм).

грационных проектов СО РАН № 93 и 94 и гранта РФФИ № 12-02-12071-офи-м.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lazareva E.V., Bryanskaya A.V., Zhmodik S.M. et al. // Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A. 2009. V. 603. P. 137.
2. Лазарева Е.В., Жмодик С.М., Петрова И.В. и др. // Поверхность. Рентген. синхротр. и нейтр. исслед. 2012. № 5. С. 1.
3. Лазарева Е.В., Брянская, А.В., Таран О.П., Жмодик С.М. // IV междунар. симп. “Биокосные взаимодействия в природных и антропогенных системах”. Сентябрь 2011 г. Санкт-Петербург, 2011. С. 42.
4. Felisa Wolfe-Simon, Jodi Switzer Blum et al. “A Bacterium That Can Grow by Using Arsenic Instead of Phosphorus”. Science. 2010. doi:10.1126/science.1197258. PMID 21127214
5. Janssens K., Proost K., Falkenberg G. // Spectrochim. Acta. Pt B. 2004. V. 59. P. 1637.
6. Iida A., Matsushita T., Gohshi Y. // Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A. 1985. V. 235. P. 597.
7. Simon R., Buth G., Hagelstein M. // Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B. 2003. V. 199. P. 554.
8. Simon R., Danilewsky A.N. // Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B. 2003. V. 199. P. 550.
9. Faubel W., Staub S., Simon R. // Spectrochim. Acta. Pt B. 2007. V. 62. P. 669.
10. Nazmov V., Reznikova E., Mohr J. et al. // J. Micromechanics and Microeng. 2011. V. 21. 0150120 (11 p).
11. Daims K., Stoecker M., Wagner M. Fluorescence in situ hybridization for the detection of prokaryotes // Advanced Methods in Molecular Microbial. Ecology. Abingdon, UK: BIOS Scientific Publishers, 2005. P. 213.
12. Porter K.G., Feig Y.S. The use of DAPI for indentifying and counting aquatic microflora // Limnol. Oceanogr. 1980. V. 25. № 5. P. 943.