

Инструменты микробиологии единичных клеток: краткий обзор

Пучков Е.О.

ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН;
puchkov@ibpm.pushchino.ru

Термин "микробиология единичных клеток" (*англ.* single-cell microbiology) появился относительно недавно [1]. В этой области микробиологии сосредоточены проблемы, решение которых возможно только на уровне единичных клеток вместе с уникальным методическим аппаратом. Проблемы, на которые нацелена микробиология единичных клеток, это гетерогенность микробных популяций, природа некультивируемых в лабораторных условиях и персистентных форм, развитие биопленок, взаимодействие микроорганизмов между собой, а также с клетками растений и животных, связь структуры и функции в метаболизме и ряд других. Развитие этой области микробиологии стало возможным лишь благодаря появлению *количественных методов анализа*, обеспечивающих необходимую чувствительность и разрешающую способность [2].

Количественная оптическая микроскопия. Оптическая микроскопия, благодаря применению лазеров, высокочувствительных детекторов света, цифровой фотографии и компьютерной техники, трансформировалась в методологию, обеспечивающую *объективные количественные* исследования пространственно-временных и физико-химических характеристик объектов в масштабах единичных клеток. Особую роль в формировании этой методологии сыграли компьютерные методы обработки и анализа цифровых изображений [3]. Они позволили не только упростить, ускорить и автоматизировать многие уже имеющиеся количественные методы, но и обеспечили получение ранее недоступной на уровне отдельных микробных клеток количественной информации. Это спектральные свойства и их пространственное распределение; размер и форма индивидуальных компонентов сложной геометрии, их взаимное расположение; интенсивность и спектральные свойства свечения (например, флуоресценции); динамика процессов в широком интервале времен [4]. Разработаны уникальные методы сверхвысокого разрешения ("наноскопии"), которые открыли возможность исследования внутриклеточных структуры с размерами порядка 0.02 – 0.04 мкм и даже отслеживать локализацию и движение отдельных макромолекул [5].

Сканирующая зондовая микроскопия. Существует несколько вариантов этого метода. В области микробиология единичных клеток пока нашли применение только сканирующая электрохимическая микроскопия (СЭХМ) и сканирующая атомно-силовая микроскопия (САСМ). Так, в частности, возможность получать "химическое изображение" редокс-активности с помощью СЭХМ широко используется в изучении биопленок микроорганизмов [6]. САСМ обеспечивает получение изображений структуры поверхности нативных микробных клеток в водной среде (что выгодно ее отличает от сканирующей электронной микроскопии) с разрешением, позволяющим выявлять и идентифицировать молекулы полисахаридов, пептидогликана, тейхоевых кислот, пилей, жгутиков и других компонентов [7]. Основанные на САСМ подходы оказались также как и СЭХМ востребованными при изучении биопленок микроорганизмов [8].

Цитометрия. Различают проточную цитометрию (ПЦ), проточную цитометрию с визуализацией (ПЦВ) и сканирующую цитометрию (СЦ). ПЦ давно используется при изучении гетерогенности и экологии микробных популяций, для оценки жизнеспособности и физиологического состояния клеток [9]. Ведутся разработки методов избирательного препаративного выделения микроорганизмов с определенными свойствами на основе ПЦ [10]. Имеются подходы на основе ПЦВ для изучения фагоцитоза, например, интернализации бактерий в мононуклеарные фагоциты [11], для выявления морфологических изменений некоторых дрожжей, связанные с приобретением факторов

патогенности [12] и ряд других. В качестве примеров применения СЦ можно отметить методики идентификации и количественного учета бактерий и грибов в различных природных [13] и клинических образцах [14].

Нано масс-спектрометрия вторичных ионов. Этот метод позволяет характеризовать наличие тех или иных химических соединений в исследуемых объектах на плоской поверхности с одновременной регистрацией их координат с разрешением в нанометровом диапазоне (получать "химическое изображение" объекта). Применение этого метода в изучении микроорганизмов на уровне единичных клеток достаточно полно отражено в обзоре [15]. В качестве примера отметим работу, в которой показаны возможности нано масс-спектрометрии вторичных ионов для изучения экологии бактерий по физиологическим характеристикам индивидуальных клеток в сопряжении с методом гибридизации ДНК *in situ* [16].

Колебательная спектроскопия. Характеристика молекул по колебательным энергетическим переходам может осуществляться с помощью инфракрасной и рамановской спектроскопии (РС). Однако только технические возможности рамановской спектроскопии позволяют ее использовать для регистрации колебательных спектров и таким образом определять химический состав отдельных микробных клеток. Разработано несколько методов, которые обладают достаточной чувствительностью для работы с единичными клетками микроорганизмов (микро-РС): SERS (Surface-Enhanced Raman Spectroscopy), TERS (Tip-Enhanced Raman Spectroscopy), CARS (Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy) и RRS (Resonance Raman Spectroscopy) [17]. В качестве примера отметим применение TERS в исследовании поверхностных полисахаридов и пептидов бактерий, в том числе в динамике, а также для идентификации бактерий и дрожжей на уровне единичных клеток [18]. Еще одно перспективное направление использования микро-РС связано с препаративным выделением отдельных клеток по определенным химическим характеристикам, своего рода химическим "отпечаткам пальцев", которые выявляются по рамановским спектрам [19].

Микробиология единичных клеток является сравнительно молодым направлением. Дальнейшее его развитие будет способствовать углублению знаний о мире микробов, а также использованию этих знаний в практических целях.

Литература

1. Brehm-Stecher B.F., Johnson E.A. (2004) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68 (3), 538-559.
2. Пучков Е.О. (2019) *Микробиология.* 88(1), 3-18.
3. Puchkov E. (2016) *J. Comp. Commun.* 4, 8-32.
4. Puchkov E. (2019) In: *Handbook of Single Cell Technologies.* (Eds. Santra T., Tseng F.G.) Springer, Singapore. pp.1-26.
5. Yao Z., Carballido-López R. (2014) *Annu. Rev. Microbiol.* 68, 459-476.
6. Zoski C.G. (2016) *J. Electrochem. Soc.* 163(4), H3088-H3100.
7. Dufrière Y.F. (2014) *MBio.* 5(4), e01363-14.
8. Angeloni L., et al. (2016) *Nanoscience and Nanometrology.* 2(1), 30-40.
9. Emerson J.B., et al. (2017) *Microbiome.* 5(1)б 86.
10. Wang Y., et al. (2009) *ISME J.* 3(8)б 889-902.
11. Drechsler-Hake D., et al. (2016) *Int. J. Med. Microbiol.* 306(6), 357-366.
12. Okagaki L.H., et al. (2010) *PLoS Pathog.* 6(6).
13. Vanhee L.M., et al. (2010) *NATO science for peace and security series A: Chemistry and Biology.* Springer, pp. 25-41.
14. Pina-Vaz C., et al. (2004) *J. Clin. Microbiol.* 42(2), 906-908.
15. Gao D., Huang X., Tao Y. (2016) *Crit. Rev. Biotechnol.* 36(5), 884-890.
16. Musat N., et al. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105(46) 17861-17866.
17. Harrison J.P., Berry D. (2017) *Front. Microbiol.* 8, 675.

18. Neugebauer U., et al. (2007) *Chemphyschem.* 8(1), 124-137.
19. McIlvenna D., et al. (2016) *Lab Chip.* 16(8), 1420-1429.