

PREISKAVE BAKTERIJ S SODOBNIM VRSTIČNIM ELEKTRONSKIM MIKROSKOPOM

Zoran Vratnica¹, Danijela Vujošević¹, Marjan Bele², Aleksander Drenik³, Alenka Vesel³, Uroš Cvelbar³, Miran Mozetič³

¹Center za medicinsko mikrobiologijo, Inštitut za zdravje Črne gore, Ljubljanska b.b., 8100 Podgorica, Srbija in Črna gora

²Kemijski Inštitut, Hajdrihova 19, 1000 Ljubljana, Slovenija

³Institut "Jožef Stefan", Jamova 39, 1000 Ljubljana, Slovenija

POVZETEK

Značilnosti različnih vrst bakterij smo preiskovali z vrstičnim elektronskim mikroskopom. Bakterije smo vzgojili v hranljivem bujonu. Odvečne hranljive snovi smo odstranili z večkratnim centrifugiranjem, tako smo dobili gosto porazdeljene bakterije v domala čisti vodi. Bakterije smo nanесли na podlage iz aluminijeve folije. Le-te smo pred nanosom temeljito aktivirali s kisikovo plazmo, s čimer smo preprečili aglomeracijo bakterij na podlagah. Nekatere bakterije smo izpostavili dolgotrajnemu vakuumu, nekatere pa nizkotlačni kisikovi plazmi. Ugotovili smo, da dobimo najlepše slike bakterij z uporabo primarnega elektronskega curka z energijo 1000 eV. Za detekcijo tankih membran smo uporabili elektrone z energijo 600 eV, ker pri večji energiji membrane niso opazne. Ugotovili smo tudi, da dolgotrajna izpostava bakterij vrste *Escherichia coli* povzroči bistvene spremembe površine, kar smo tolmačili z izgubo vode in padcem citoplazmatskega tlaka v bakteriji. Pokazali smo, da kisikova plazma močno poškoduje bakterije, saj dobimo po plazemski obdelavi na površini le še ostanke celične membrane.

Bacteria examination with modern scanning electron microscope

ABSTRACT

Typical characteristics of different bacteria were the subject of examination with modern scanning electron microscope. Bacteria were cultivated on culture medium substrate, where the medium substrate was removed. Separately, the bacteria were brought to aluminium substrate that was plasma activated to prevent conglomeration. Some bacteria were exposed to long term vacuum and the others to oxygen plasma. The best SEM images were done at 1 keV, whereas for bacteria membrane detection the 600 eV primary electron beam was used. It was observed that long term exposure of bacteria *Escherichia coli* caused changes in bacteria surface, due to loss of water and fall of cytoplasmatic pressure in bacteria. After the plasma treatment, due to membrane eruption we are left only with leftovers of the cells membrane.

1 UVOD

Bakterije so živa bitja, ki se nahajajo povsod okoli nas. Imajo pomembno vlogo v ekosistemih. Za človeka so nekatere bakterije pomembne, ker uravnavajo mnoge procese v telesu (predvsem v prebavnem traktu), druge pa so patogene, ker lahko izzovejo različne bolezni. Raziskave bakterij so pomembne tako z vidika ohranjanja zdravja živih bitij kot tudi zaradi razumevanja osnovnih bioloških procesov. Bakterije in njihove modifikacije, ki so posledica spremenjenih zunanjih okoliščin, lahko preiskujemo z različnimi metodami, ki pa so običajno posredne⁽¹⁻⁷⁾. Pomembne podatke o stanju bakterij je mogoče dobiti z vrstičnim elektronskim mikroskopom. Elektronski

mikroskop je najbolj razširjen instrument za opazovanje površinskih značilnosti materialov. Najlepše posnetke dobimo pri električno prevodnih vzorcih, ki so zelo gladki. Preiskave neprevodnih materialov so zahtevnejše, ker se na vzorcu med preiskavo kopiči električni naboj, ki zmanjša ločljivost metode. Pojav lahko izničimo tako, da na površino vzorca pred preiskavo napršimo tanek sloj prevodnega materiala (navadno je to zlato). Žal takšna priprava vzorca ni posebej primerna za biološka tkiva, ker jih lahko med nanosom tanke plasti zlata poškodujemo.

2 OSNOVNE ZNAČILNOSTI BAKTERIJ

Bakterije so najmanjši organizmi, sposobni za samostojno življenje. Sestavljene so iz ene same celice, ki je lahko okrogle ali podolgovate oblike. Značilna velikost bakterij je okoli 1 μm . Ker se vse življenjske funkcije dogajajo v eni sami celici, je njihova struktura nekoliko drugačna od strukture celic večjih organizmov. Zaradi tega se bakterije navadno dobro prilagajajo na različne vplive iz okolice. Bakterije so zgrajene iz ovojnice, ki je pogosto večplastna.

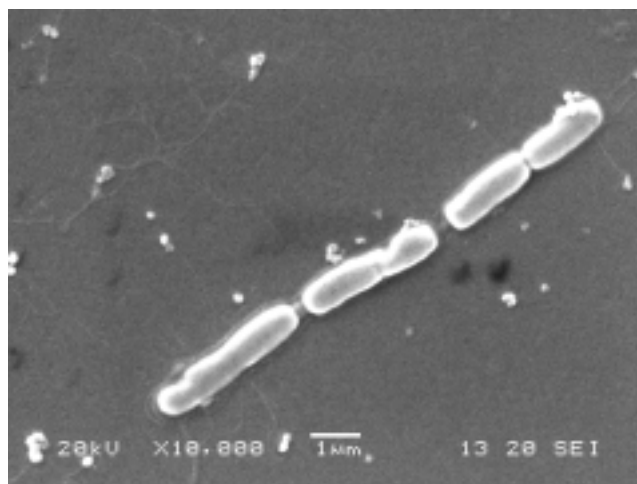
Citoplazmatska membrana neposredno ovija notranje strukture v celici. Debelina te membrane je 5–10 μm , po strukturi pa je lipoproteinski mozaik. Citoplazmatska membrana ima pomembno vlogo pri kontroli procesov izmenjave različnih snovi med bakterijo in okolico, prav tako pa pomembno vpliva na deljenje celice (razmnoževanje bakterij). Citoplazmatsko membrano obdaja celična stena. To je zelo čvrsta elastična membrana debeline 10–50 μm , odvisno od vrste bakterije. Glede na zgradbo celičnega zidu ločimo dve veliki skupini bakterij: Gram pozitivne in Gram negativne. Delitev so uvedli kot posledico različne dovzetnosti za barvanje z bakteriološkimi barvami, ki se pogosto uporabljajo za določanje vitalnosti bakterij. Celična stena Gram pozitivnih bakterij je sestavljena pretežno iz peptidoglikana (murein). To je mrežasta struktura, ki je sestavljena iz dolgih verig n-acetil muraminske kisline in n-acetil glikozamina, ki so prečno povezane s kratkimi verigami aminokislin. Takšna struktura deluje kot nekakšna gosta mrežica, v katero so vezane

teihoična kislina in različne druge molekule, odvisno od vrste bakterije. Celična stena Gram negativnih bakterij je tanjša, vendar je njena struktura precej bolj zapletena. Notranji del je sestavljen iz tankega sloja peptidoglikana, ki se nahaja neposredno nad citoplazmatsko membrano. Zunanji del je komplicirana struktura, sestavljena iz lipoproteina, lipopolisaharida in fosfolipida. Takšna, izredno čvrsta struktura celične stene daje bakteriji značilno obliko, obenem pa omogoča, da bakterije prenesejo visok intracelularni tlak (do 25 bar). Zaradi dobre kemijske inertnosti materialov, ki sestavljajo celično steno, so bakterije tudi zelo odporne proti različnim vplivom iz okolice.

V bakteriji se nahaja citoplazma, ki je koloidna mešanica različnih molekul. Sestavljena je iz okoli 80 % vode, v kateri so različni ioni, aminokisliline, proteini, purini, pirimidini, nukleotidi, različni ogljikovi hidrati, vitamini, različni razgradni produkti in podobno.

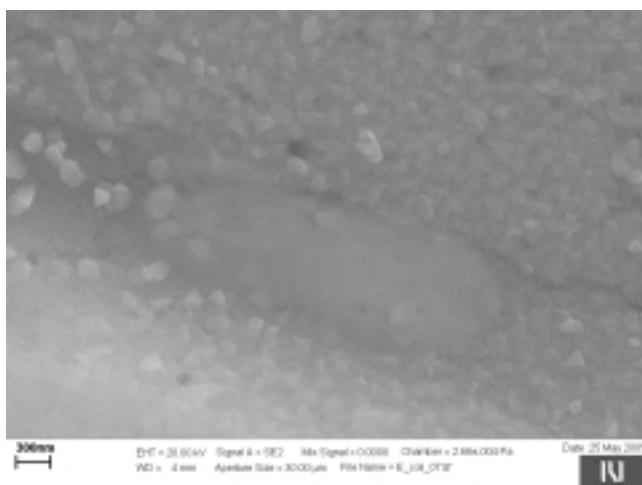
3 PREISKAVE BAKTERIJ Z MIKROSKOPOM NA POLJSKO EMISIJO ELEKTRONOV

Navadni elektronski mikroskopi delujejo pri energiji primarnega curka elektronov okoli 20 000 eV. Takšni mikroskopi niso posebej primerni za preiskave bakterij, saj jih energijski elektroni pogosto poškodujejo (posebej pri visokih povečavah). Druga težava pri uporabi mikroskopov z veliko kinetično energijo primarnega curka elektronov je šibko sipanje elektronov na zunanji ovojnici bakterije. Prosta pot elektronov v trdni (ali tekoči) snovi je odvisna od vrste snovi in kinetične energije elektronov. Za materiale, ki jih sestavljajo lahki atomi (vodik, ogljik, kisik, dušik), je prosta pot precej večja kot pri kovinskih materialih. Najmanjša je prosta pot pri kinetični energiji elektronov okoli 100 eV, potem pa z naraščajočo

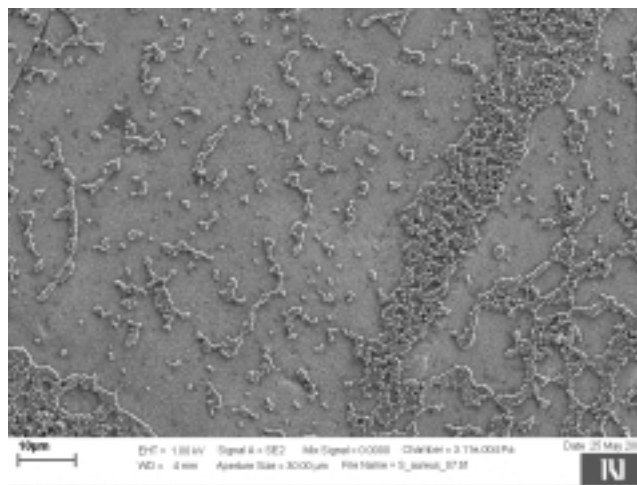


Slika 2: Posnetek bakterij pri kinetični energiji primarnega curka elektronov 20 000 eV. Na površino vzorca smo pred analizo napršili tanek sloj zlata. Posnetek je bil narejen s klasičnim elektronskim mikroskopom.

kinetično energijo močno narašča. Slabotno sipanje hitrih elektronov na površini organske snovi ima dve neprijetni posledici: 1. celična membrana postane prozorna za takšne elektrone, kar pomeni, da sipani elektroni nosijo informacijo tudi iz notranjosti, 2. elektroni oddajo energijo v notranjosti bakterije in s tem povzročijo močno lokalno ogrevanje bakterije in s tem spremembo njenih lastnosti. Na sliki 1 prikazujemo posnetek bakterije vrste *Escherichia coli*, ki smo ga naredili pri standardnih parametrih, značilnih za klasični elektronski mikroskop, to je pri energiji primarnega curka elektronov 20 000 eV. Bakterijo komajda opazimo, saj sekundarni elektroni izvirajo iz celotne prostornine bakterije. Slika je zato izredno razmazana, opaziti pa je celo podrobnosti morfologije pod bakterijo. Takšen posnetek je neuporaben. Če želimo pripraviti spodobno sliko bakterije



Slika 1: Posnetek bakterije pri kinetični energiji primarnega curka elektronov 20 000 eV



Slika 3: Bakterije *Staphylococcus aureus* na dobro aktivirani aluminijevi foliji pri majhni povečavi



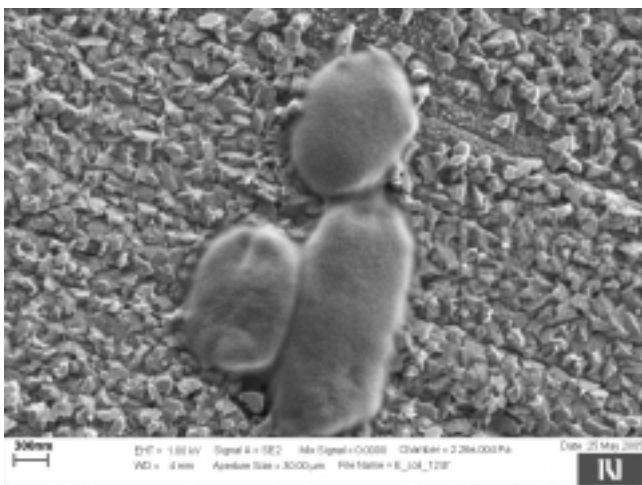
Slika 4: Bakterije *Staphylococcus aureus* na dobro aktivirani aluminijevi foliji pri veliki povečavi

pri takšni energiji elektronskega curka, je potreben predhodni nanos zlata. V tem primeru dobimo dokaj dobro sliko bakterije (slika 2), vendar pa nam zlato prepreči detekcijo morfologije celične membrane.

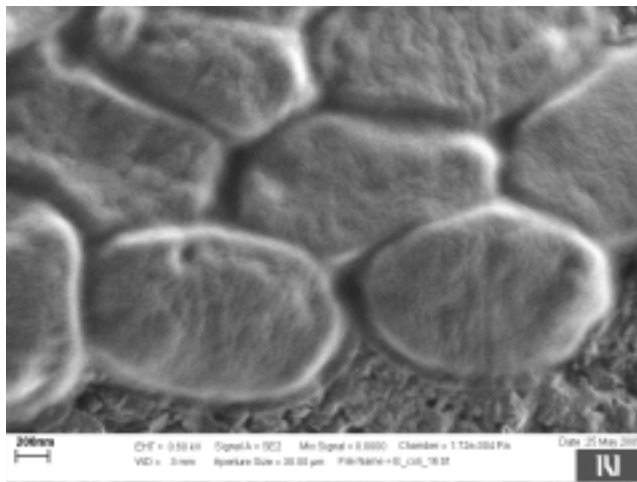
4 SISTEMATIČNE PREISKAVE BAKTERIJ Z NIZKOENERGIJSKIM CURKOM PRIMARNIH ELEKTRONOV

Za preiskave z elektronskim mikroskopom smo pripravili različne vrste bakterij, ki smo jih vzgojili v bujonu (vodni raztopini hranilnih snovi). Bakterije smo z večkratnim centrifugiranjem ločili od hranilnih snovi, tako da smo dobili znatno koncentracijo bakterij v domala čisti vodi. Takšna priprava je nujno potrebna, ker bi sicer na površino vzorcev nanесли tudi hranilne snovi, ki bi prekrile bakterije.

Kapljice vode z bakterijami smo nanесли na aluminijevo folijo. Da bi preprečili aglomeracijo



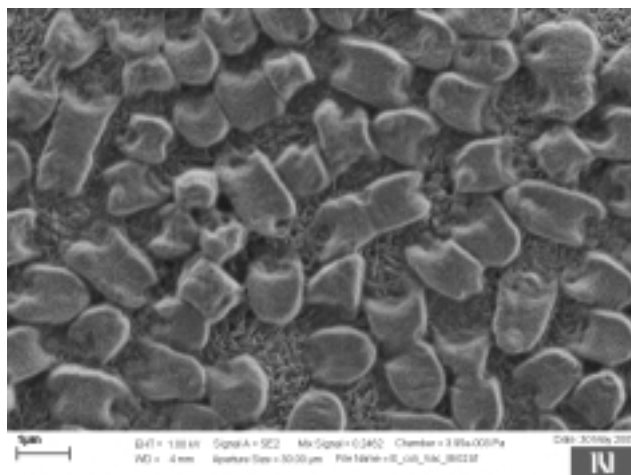
Slika 5: Bakterije *Escherichia coli*. Posnetek je bil narejen pri kinetični energiji primarnega curka elektronov 1000 eV.



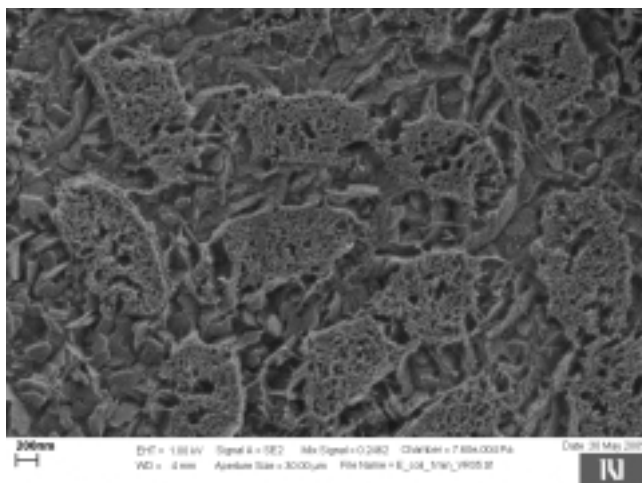
Slika 6: Bakterije *Escherichia coli*. Posnetek je bil narejen pri kinetični energiji primarnega curka elektronov 600 eV.

bakterij na površini aluminijeve folije, smo le-to pred nanosom dobro aktivirali. Odlično aktivacijo površine folije smo dosegli s kratkotrajno izpostavo nizkotlačni kisikovi plazmi. Kapljica vode z bakterijami je zaradi tega odlično omočila folijo. Bakterije vrste *Staphylococcus aureus* (ki sicer slovijo po tem, da najrajši tvorijo kroglaste skupke) nam je zato uspelo nanesti v enojnem sloju, kar brez predhodne aktivacije ni mogoče doseči. Bakterije *Staphylococcus aureus* prikazujemo na sliki 3, na sliki 4 pa so iste bakterije pri večji povečavi.

Na sliki 5 so prikazane bakterije *Escherichia coli*. Posnetek je bil narejen pri kinetični energiji primarnega curka elektronov 1000 eV. Opazimo lahko dokaj pravilno obliko bakterije, ni pa opaziti zunanje celične stene, ki je očitno precej prozorna tudi za elektrone s takšno energijo. Za opazovanje stene smo zato izbrali elektrone z najnižjo energijo, ki še omogoča kakovostne posnetke. Na sliki 6 je bakterija *Escherichia*



Slika 7: Bakterije *Escherichia coli* po dolgotrajni izpostavi vakuumu



Slika 8: Bakterije *Escherichia coli* po izpostavi kisikovi plazmi

coli, posneta pri energiji 600 eV. Na tem posnetku prepoznano zunanjo steno kot tanek prstan okoli bakterije. Debelina stene je okoli 50 nm.

Preiskovali smo tudi vpliv vakuumu na lastnosti bakterije *Escherichia coli*. Znano je, da večina bakterij preživi kratkotrajno izpostavo vakuumu, dolgotrajna izpostava pa je za bakterije škodljiva. Izbrane vzorce smo namestili v vakuumski sistem, ga izčrpali do končnega tlaka (okoli 1 Pa) in pustili v vakuumu 20 h. Bakterije, ki so bile izpostavljene takšnim okoliščinam, so prikazane na sliki 7. Opazimo lahko, da so bakterije izgubile svojo prvotno obliko – postale so vbočene. Iz tega lahko sklepamo, da bakterije te vrste slabo prenašajo dolgotrajno izpostavo vakuumu. Celična membrana očitno ne zmore zadržati vode v citoplazmi. Voda počasi difundira na površino membrane, kjer zaradi nizkega tlaka v okolici odpari. Posledica je padec tlaka v notranjosti bakterije, kar povzroči vbočenje celične membrane.

Bakterije vrste *Escherichia coli* smo izpostavili delovanju nizkotlačne šibkoionizirane hladne kisikove plazme. Takšna plazma bi lahko bila koristna pri sterilizaciji različnih podlag, za katere klasični postopki sterilizacije niso primerni. Gre predvsem za biokompatibilne podlage za gojenje organskih tkiv in za različne vsadke (na primer umetne žile), ki ne prenesejo ogrevanja in sterilizacije s toksičnimi snovmi. Podlage z bakterijami smo izpostavili plazmi z gostoto nevtralnih kisikovih atomov okoli $5 \cdot 10^{20} \text{ m}^{-3}$ za eno minuto. Fotografija bakterij po plazemski obdelavi je prikazana na sliki 8. Kisikova plazma je očitno primeren medij za uničevanje bakterij *Escherichia coli*. Vse, kar je ostalo od bakterije po

plazemski obdelavi, je ostanek celične membrane. Kot smo že omenili, je le-ta sestavljena iz kemijsko zelo odpornih snovi. Kisikovi radikali selektivno jedkajo membrano, dokler ne postane dovolj tanka in zato prepustna za citoplazmo. Citoplazma odhlapi iz bakterije, tako da na površini podlage ostane le še močno poškodovana celična membrana. Z dolgotrajnejšo plazemsko obdelavo bi verjetno odstranili tudi te ostanke.

5 SKLEP

Preiskovali smo značilnosti nekaterih bakterij. Površino bakterij smo opazovali z vrstičnim elektronskim mikroskopom s poljsko emisijo elektronov (FE-SEM, Supra 35 VP, Carl Zeiss, Oberkochen, Nemčija). Ugotovili smo, da je tovrsten mikroskop zelo primeren za opazovanje bakterij. Nasprotno od klasičnih elektronskih mikroskopov ima naša naprava naslednje prednosti:

- Vzorcev ni treba prekriti z električno prevodno plastjo.
- Energijo primarnega curka elektronov je mogoče znižati do 600 eV, ne da bi se bistveno spremenila ločljivost mikroskopa.
- S spreminjanjem energije primarnega curka elektronov je mogoče opazovati tudi zelo tanke ovojnice, ki so sicer praktično prozorne za hitre elektrone.

Zahvala

Ta članek je rezultat skupnega dela slovenskih in črnogorskih raziskovalcev v okviru projekta BI-SCG/04-05-št. 28: Plazemska sterilizacija mikroorganizmov, v okviru SLO-CG znanstveno-tehničnega sodelovanja.

Literatura

- ¹Krebs M. C., Becasse P., Verjat D., Darbot J.C, Int. J. Pharm. 160 (1998), 75–81
- ²Mozetič M., Mozetič T. and Panjan P., Vakuunist 21: 10–12 (2001)
- ³Vesel A. and Mozetič M., Vakuunist 23 (2003), 9–14
- ⁴Bar W, de Bar GM, Naumann A, Rusch-Gerdes S, American Journal of Infection Control 29 (2001) 5, 306–311
- ⁵Moisan M, Barbeau J, Moreau S, Pelletier J, Tabrizian M, Yahia LH, Int. J. Pharm. 226 (2001) 1–2, 1–21
- ⁶Ferreira SD, Dernell WS, Powers BE, Schochet RA, Kuntz CA, Withrow SJ, Wilkins RM, Clinical Orthopaedics and Related Research 388 (2001), 233–239
- ⁷Moisan M, Barbeau J, Pelletier J, Vide-Science Technique et Applications 56 (2001) 299, 15–28