

**М.А. Фомина, В.С. Подгорский**

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,  
ул. Заболотного, 154, Киев ГСП, Д03680, Украина*

## **ВЛАЖНО-РЕЖИМНАЯ СКАНИРУЮЩАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ КАК ИНСТРУМЕНТ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОГЕОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ОБРАЗОВАНИЯ БИОМИНЕРАЛОВ ГРИБАМИ**

*Целью работы было исследование возможностей использования одной из новейших технических разработок в сканирующей электронной микроскопии – влажно-режимной СЭМ для изучения биогеохимических процессов образования биоминералов микромицетами. Объектом исследования был микроскопический гриб *Beauveria caledonica*, известный своей способностью к трансформации металлов и минералов. В ответ на присутствие фосфата меди в среде наблюдалось обильное образование кристаллов оксалаата меди в грибном мицелии. Оптимальная визуализация во влажном режиме была достигнута при давлении в камере образцов около 6 торр и относительной влажности 85–90 %. Сравнение наблюдений, полученных с использованием высоковакуумной и влажно-режимной сканирующей электронной микроскопии, показали, что грибные гифы и мицелиальные тяжи в естественном состоянии окружены толстыми гидратированными слизистыми оболочками, которые и служат матриksom для биогеохимических процессов образования и роста кристаллов вторичных минералов. Влажно-режимная и высоковакуумная сканирующие электронные микроскопии взаимодополняют друг друга во всестороннем исследовании биогеохимической роли микроскопических грибов в трансформации металлов и минералов.*

Ключевые слова: сканирующая электронная микроскопия, ESEM, микроскопические грибы, биогеохимия, биоминералы, *Beauveria caledonica*.

Микроскопические грибы являются фундаментальной частью почвенной микробиоты с наибольшей общей биомассой. В неблагоприятных условиях, будучи чрезвычайно устойчивыми к высокой кислотности и загрязнённости токсичными металлами и радионуклидами, они часто становятся доминирующей группой микроорганизмов.

Грибы играют фундаментальную роль в биогеохимическом круговороте металлов и металлоидов, и трансформациях минералов в природе [1, 5, 8]. Они способны, с одной стороны, растворять минералы и мобилизовать ионы металлов. С другой стороны, известна способность грибов, как к внеклеточному, так и внутриклеточному образованию нерастворимых соединений металлов, в том числе и опасных для окружающей среды и здоровья человека токсичных металлов, тем самым ограничивая их распространение по трофическим цепям [6, 7]. Имобилизация металлов грибами может приводить к образованию твёрдых веществ с высокой степенью упорядоченности атомной структуры, то есть вторичных минералов грибного происхождения [5, 8]. Биогеохимический потенциал грибов и образование ими биоминералов имеют большое значение как для биогеохимии Земли, так и для разработок биоремедиационных технологий.

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) является одним из важнейших методических подходов в биогеохимических исследованиях. Кроме того, СЭМ широко используется в микологии для изучения морфологии различных грибных структур. Этот метод успешно применяется для исследования жёстких микроструктур грибов с низким содержанием воды. Он позволяет различать важные детали строения спор и спороносных структур, апрессориев, плодовых тел, и тем самым помогает в решении спорных таксономических и биологических вопросов, в изучении морфологической изменчивости и механизмов проникновения в субстраты и распространения грибов. Однако традиционная СЭМ имеет ряд технических ограничений, осложняющих биогеохимические ис-

следования микроскопических грибов. Это связано с необходимостью использования высокого вакуума, что часто требует сложной подготовки биологических образцов, включающей фиксацию, обезвоживание и, часто, сушку в критической точке, что приводит к появлению артефактов, искажениям при визуализации и затруднениям в интерпретации наблюдений [8, 10, 13]. Дополнительные сложности связаны также с сочетанием биологического и минерального материалов в геобиологических образцах, когда, например, при традиционной подготовке образцов могут полностью утрачиваться вторичные минералы, образованные микроорганизмами [8]. С момента её описания и первых разработок около 25 лет назад [3], влажно-режимная СЭМ привлекла большое внимание благодаря возможности визуализации биологических объектов без предварительной разрушительной подготовки образцов в их естественном влажном состоянии.

Данная работа посвящена исследованию возможностей влажно-режимной сканирующей электронной микроскопии для изучения биогеохимических процессов образования биоминералов грибами.

**Материалы и методы.** Исследования проводились с использованием почвенного микроскопического гриба *Beauveria caledonica* Bisset et Widden (Cordycipitaceae, Нуростреалес, Ascomycota) из коллекции микроорганизмов Геомикробиологической группы Университета г. Данди (Великобритания). У этого микромицета, относящегося к специфической группе энтомопатогенных анаморфных грибов, ранее были описаны уникальные способности к биогеохимической трансформации металлов и минералов благодаря образованию большого количества шавелевой кислоты [5]. Гриб выращивался в течение 2-х месяцев при 25°C в чашках Петри с модифицированной агаризованной средой Мелина-Норкранса с 5 mM  $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Fluka) [5]. Агаровые диски диаметром 7 мм с 14-дневным мицелием инокулировали на стерильные целлофановые мембраны, помещённые на поверхность агаризованной среды для облегчения манипуляции с биомассой. Эксперименты проводились в трёх повторностях. Мембраны с выросшим на них мицелием гриба скальпелем разрезали на квадраты со стороной 5–7 мм для последующей сканирующей электронной микроскопии, сравнивая наблюдения во влажном режиме с традиционным высоковакуумным режимом. Образцы для высоковакуумного режима помещали на алюминиевые цилиндрические держатели для образцов и высушивали на воздухе в эксикаторе, наполненном силикагелем, в течении 1–2 суток. Ранее было показано, что сушка геомикробиологических образцов на воздухе является одним из самых простых, безопасных и эффективных способов подготовки материала для наблюдения взаимодействия микроскопических грибов с минералами в высоковакуумном режиме по сравнению с традиционными жёсткими методами подготовки, при которых теряются вторичные минералы, или фиксацией образцов в чрезвычайно токсичных парах глутеральдегида [5, 8]. Затем, для увеличения проводимости, образцы напылялись 30-наннометровым слоем сплава золота и палладия с помощью Cressington 208 HR sputter coater и исследовались в СЭМ Philips XL30 Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM) с полевой эмиссией электронной пушки при ускоряющем напряжении 15–25 кэВ в высоковакуумном режиме. Сочетание традиционного СЭМ с энерго-дисперсионным рентгеновским микроанализом (EDX) позволяет получать спектр характеристического рентгеновского излучения и идентифицировать элементный состав в определённых точках образца.

Для исследования образцов в их естественном гидратированном состоянии использовали Philips XL30 ESEM во влажном режиме.

Влажно-режимная сканирующая электронная микроскопия основана на разделении внутренней колонны микроскопа на две зоны: высоковакуумную зону в электронной колонне с давлением  $10^{-7} - 10^{-4}$  торр (мм рт. ст.), и низковакуумную зону в камере образцов с давлением около 10 торр. Между этими зонами находится система ограничивающих давление апертур (PLAs), которые позволяют высокоэнергетическому сфокусированному электронному пучку попадать в низковакуумную камеру образцов, в которую закачиваются водяные пары [3, 10, 13]. Вторичные электроны, выбиваемые из поверхности образца, взаимодействуют с молекулами воды водяного пара, тоже образуя вторичные

электроны, которые, в свою очередь, образуют ещё большее количество вторичных электронов при взаимодействии с молекулами воды. Таким образом, водяной пар функционирует как каскадный усилитель сигнала вторичных электронов, исходя от образца. Этот усиленный сигнал вторичных электронов регистрируется специально модифицированным для работы в газовой атмосфере газовым вторично-электронным детектором (GSED) [3]. Такое техническое решение позволяет работать с влажными и непроводящими образцами без какой-либо предварительной подготовки, и визуализации в их естественном состоянии при разрешении около 2 нм. Кроме того, влажно-режимная сканирующая электронная микроскопия так же, как и традиционная высоковакуумная, позволяет анализировать элементный состав образца с помощью энергодисперсионного рентгеновского микроанализа [10, 13].

Свежеотобранные образцы для сканирующей электронной микроскопии во влажном низковакуумном режиме помещали в камеру образцов на специальных алюминиевых цилиндрических держателях и анализировались без какой-либо предварительной подготовки.

**Результаты.** Микроскопический гриб *B. caledonica* трансформировал фосфат меди в оксалат меди, осаждавая кристаллы вторичного минерала, как в микроокружении гриба, так и в грибной биомассе (Рис. 1А). Обильное образование кристаллов наблюдалось на мицелиальных тяжях, формирующихся грибом в ответ на присутствие фосфата меди и атипичных в нормальных условиях. Спектры характеристического рентгеновского излучения, полученные с использованием энергодисперсионного рентгеновского микроанализа, совмещённого с электронной микроскопией, показали наличие меди, углерода и кислорода в зонах кристаллов (Рис. 1В). Полная идентификация вторичного минерала, проведенная с помощью рентгеноструктурного анализа, подтвердила, что гриб образует гидратный оксалат меди  $\text{CuC}_2\text{O}_4 \cdot n(\text{H}_2\text{O})$  ( $n < 1$ ).

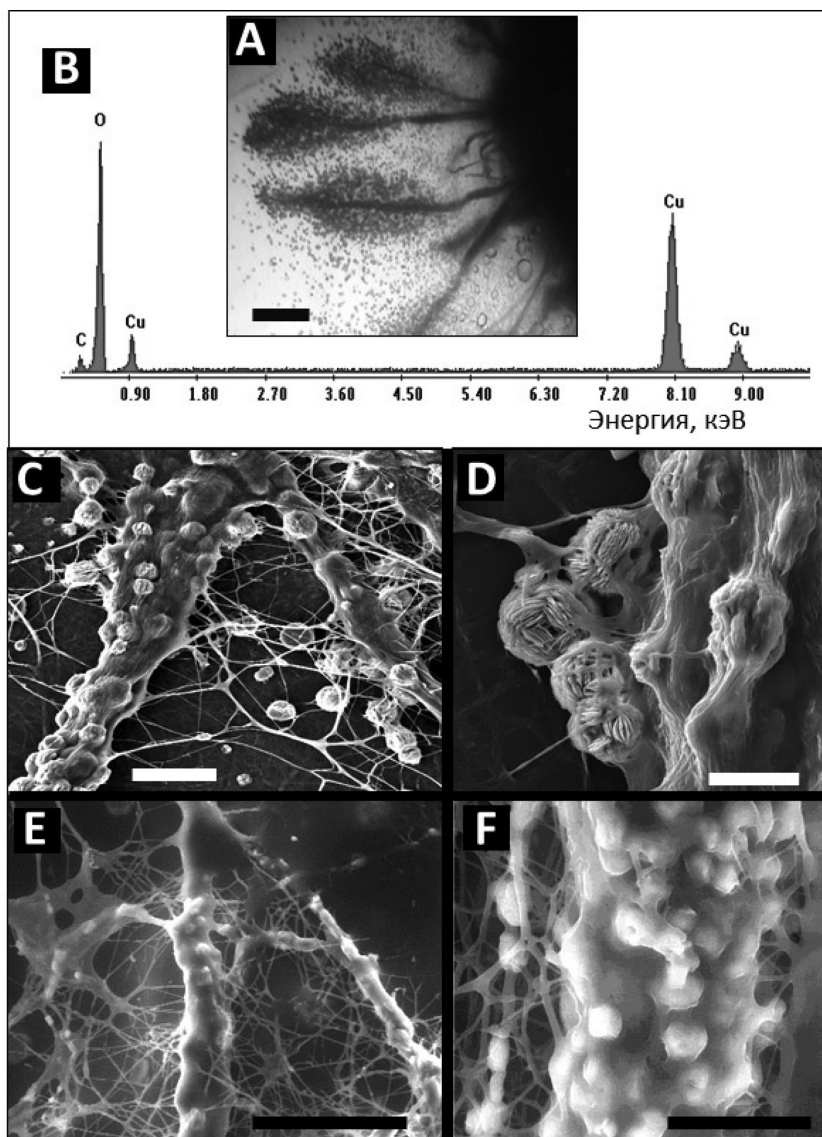
Сравнение наблюдений, полученных с использованием высоковакуумной и влажно-режимной сканирующей электронной микроскопии, показали, что грибные гифы и мицелиальные тяжи в естественном состоянии окружены толстыми гидратированными слизистыми оболочками, которые и служат матриксом для биогеохимических процессов, образования и роста кристаллов вторичных минералов (Рис. 1С-Е). Высушивание образцов для высоковакуумной СЭМ, сжимая и разрушая слизистые оболочки, обнажало кристаллы вторичного минерала с типичной для гидратного оксалата меди орторомбической кристаллической структурой (Рис. 1С, D). Тогда как наличие гидратированных слизистых оболочек при использовании влажно-режимной СЭМ существенно затрудняли детальное исследование морфологии кристаллов, образованных грибами (Рис. 1Е, F). С другой стороны, общей тенденцией было то, что при высоковакуумном режиме наблюдались более крупные кристаллы, чем в необработанных образцах при влажном режиме. Так размеры кристаллов при высоковакуумном режиме достигали размеров  $16,10 \pm 6,14$  мкм, тогда как при влажном режиме они были почти в четыре раза меньше, составляя  $4,12 \pm 1,45$  мкм ( $n=25$ ). Это можно объяснить тем, что условия такой предобработки образцов, как высушивание, способствуют росту кристаллов.

Оптимизация условий для получения качественного изображения исследованных образцов проводилась путём варьирования давления в диапазоне 4–10 торр в камере образцов. При давлении около 9 торр и выше наблюдался толстый слой сконденсированной воды, маскирующий объект, а при давлении около 4.5–5 торр образцы быстро обезвоживались и слизистые оболочки, окружающие мицелий, сжимались и разрушались. Оптимальная визуализация исследуемых образцов во влажном режиме была достигнута при давлении в камере образцов около 6 торр и относительной влажности 85–90 %.

**Обсуждение.** Влажно-режимная сканирующая электронная микроскопия, предоставляющая существенные преимущества для биологических и медицинских исследований всё ещё совершенствуется и далека от стандартизации [13]. Несмотря на возможность работы с биологическими образцами без сложных и вызывающих артефакты предварительных манипуляций, для влажно-режимной СЭМ характерны некоторые недостатки и ограничения [10, 13]. К техническим ограничениям влажно-режимного СЭМ относится

полезное расстояние в камере образцов, на котором возможно использовать электронный пучок в газовой атмосфере. Расстояние является функцией от ускоряющего напряжения, заряда электронного пучка, природы и давления газа и может составлять от 10 мм до 1 мм [10]. При высоких давлениях это ограничение приводит к резкому уменьшению поля зрения и осложнению визуализации.

Комбинация низкой температуры (например, 4°C) и высокого давления паров (например, 6.1 торр) в камере образцов позволяет достигать 100 % относительной влажности на поверхности образца, которая не даёт образцу обезвоживаться в процессе микроскопии



**Рис. 1. Образование оксалата меди грибом *Beauveria caledonica*, выращенного в присутствии фосфата меди: (A) фрагмент колонии, полученный с использованием световой микроскопии; (B) типичная спектрограмма характеристического рентгеновского излучения в зоне кристаллов при ускоряющем напряжении 25 кэВ; (C, D) образцы, высушенные на воздухе и напылённые золотом и палладием, полученные с использованием высоковакуумной СЭМ; (E, F) необработанные образцы, полученные с использованием влажнорежимной СЭМ при давлении водных паров в камере образцов 6 торр. Длина масштабной линейки: (A) 200 мкм; (C, E) 100 мкм; (D, F) 25 мкм.**



[3, 13]. Однак в разі медико-біологічних образців багато авторів повідомляли про труднощі роботи з використанням волого-режимної СЕМ, включаючи низький контраст і затривану візуалізацію, викликані шаром сконденсованої води на поверхні образця [13]. Отримання зображень може оптимізуватися шляхом маніпулювання такими ключовими параметрами, як тиск в камері образців, корисна відстань і прискорююче напруження електронного пучка [3, 13]. Оптимізація робочих умов, як і в нашому разі, часто є специфічною для конкретних образців і, швидше за все, буде продовжувати визначатися емпіричним шляхом [12-14]. Раніше повідомлялося, що в дослідженнях необроблених біологічних образців найкраща візуалізація поверхні спостерігалася, коли відносна вологість в камері образців була близько 85 % при поєднанні температури 4–6°C і тиску 5.2 – 5.9 торр [14], що було близько до наших експериментів.

Геомікробіологічні образці з біомінералами мікробного походження складають в собі елементи як біологічної, так і мінеральної природи, які по-різному реагують на фізичні впливи характерні для електронної мікроскопії [5, 8, 10]. Для того щоб зрозуміти, як відбувається процес біомінералізації, викликаний мікроскопічними грибами, дуже важливо максимально наблизити умови спостереження до природних і зберегти взаємозв'язок мінералів з крихкою системою мицелії, покритою слизовою оболонкою, що включає в себе вивільнені полімерні речовини. Волого-режимна електронна мікроскопія (ESEM) надає унікальну можливість для неструктурного спостереження над біогеохімічними процесами і вже використовувалася в ряду геомікробіологічних досліджень [2, 4, 9-11, 15]. Перша спроба візуалізувати утворення грибних біомінералів у волого-режимній СЕМ була описана для грибів, викликаючих дерев'яну гниль [2]. Авторів виявили, що оксалат кальцію накопичувався і кристалізувався в оточуючій мицелії товстої слизової гідратованої оболонці подібно тому, що, в нашому разі, спостерігалось для утворення *B. caledonica* кристалів гідратного оксалату міді.

Враховуючи літературні дані і наш практичний досвід, можна зробити висновок, що в даний момент волого-режимна СЕМ, що дозволяє вивчати геомікробіологічні образці в їх природному стані, не може повністю замінити традиційну високовакуумну СЕМ, яка забезпечує детальну візуалізацію тонких структур при високих збільшеннях [5, 10, 13]. Ці два методичні підходи, взаємодоповняючи один одного, дозволяють краще зрозуміти роль мікроскопічних грибів в трансформації металів і мінералів і їх взаємодія з мікрооточенням, в якому відбувається утворення біомінералів мікроорганізмами.

*Автори висловлюють подяку співробітникам Університету г. Данді (Великобританія) інженеру Мартину Кієрансу за технічну допомогу в скануючій електронній мікроскопії і професору Джейффри М. Гедду за надану можливість проведення цієї роботи.*

**М.О. Фоміна, В.С. Підгорський**

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,  
буль. Заболотного, 154, Київ ГСП, Д03680, Україна.*

## **ВОЛОГО-РЕЖИМНА СКАНУЮЧА ЕЛЕКТРОННА МІКРОСКОПІЯ ЯК ІНСТРУМЕНТ ДОСЛІДЖЕННЯ БІОГЕОХІМІЧНИХ ПРОЦЕСІВ УТВОРЕННЯ БІОМІНЕРАЛІВ ГРИБАМИ**

### **Резюме**

Метою роботи було дослідження можливостей використання однієї з новітніх технічних розробок у скануючій електронній мікроскопії – волого-режимної СЕМ для вивчення біогеохімічних процесів утворення біомінералів мікроміцетами. Об'єктом дослідження був мікроскопічний гриб *Beauveria caledonica*, відомий своєю здатністю до трансформації металів та мінералів. У відповідь на присутність фосфату купрум у середовищі спостерігалось чітке утворення кристалів оксалату купрум в грибному мицелії. Оптимальна візуалізація у

вологому режимі була досягнута при тиску в камері зразків близько 6 торр та відносній вологості 85–90 %. Порівняння спостережень, які були отримані за допомогою високовакуумної та волого-режимної скануючої електронної мікроскопії, показали, що грибні гіфи та міцеліальні тяжі в природному стані оточені товстими гідратованими оболонками, які служать матриксом для біогеохімічних процесів утворення та росту кристалів вторинних мінералів. Волого-режимна та високовакуумна скануюча електронна мікроскопія взаємодоповнюють одна одну у різносторонньому дослідженні ролі мікроскопічних грибів у трансформації металів та мінералів.

Ключові слова: скануюча електронна мікроскопія, ESEM, мікроскопічні гриби, біогеохімія, біомінерали, *Beauveria caledonica*.

**M.A. Fomina, V.S. Podgorsky**

*Institute of Microbiology and Virology, NASU, 154, Academ. Zabolotny str., Kyiv GSP, D03680, Ukraine*

## **WET-MODE SCANNING ELECTRON MICROSCOPY AS AN INSTRUMENT FOR STUDIES OF BIOGEOCHEMICAL PROCESSES OF FUNGAL BIOMINERALS FORMATION**

### Summary

The aim of this work was to examine the potential of the use of one of the modern approaches in scanning electron microscopy – the wet mode ESEM to study biogeochemical processes of biominerals formation by micromycetes. The object of the study was microscopic fungus *Beauveria caledonica* known for its ability to transform metals and minerals. In response to the presence of copper phosphate in the medium, it was observed the abundant formation of copper oxalate crystals in fungal mycelium. Optimal visualization at wet mode was achieved at the sample chamber pressure around 6 torr and relative humidity 85 – 90 %. The comparison of the observations obtained using high-vacuum mode and wet mode scanning electron microscopy showed that in their natural state fungal hyphae and mycelial cords are surrounded by thick hydrated mucilaginous sheath which serves as a matrix for biogeochemical processes of secondary minerals formation and growth. The wet mode and high-vacuum mode scanning electron microscopies complement each other in comprehensive study of biogeochemical role of microscopic fungi in transformations of metals and minerals.

Key words: scanning electron microscopy, ESEM, microscopic fungi, biogeochemistry, biominerals, *Beauveria caledonica*.

1. *Burford E.P., Fomina M., Gadd G.M.* Fungal involvement in bioweathering and biotransformation of rocks and minerals // *Mineral. Mag.* – 2003. – 67, N 6. – P. 1127–1155.
2. *Connolly J.H., Jellison J.* Calcium translocation, calcium oxalate accumulation, and hyphal sheath morphology in the white rot fungus *Resinicium bicolor* // *Can. J. Bot.* – 1995. – 73, N 6. – P. 927–936.
3. *Danilatos G.D.* Foundations of environmental scanning electron microscope // *Adv. Elect. Electron. Phys.* V.71. – San-Diego: Academic Press, 1988. – P. 109–250. (ISBN 0120146711).
4. *Douglas S., Douglas D.D.* Environmental scanning electron microscopy studies of colloidal sulphur deposition in a natural microbial community from a cold sulfide spring near Ancaster, Ontario, Canada // *Geomicrobiol. J.* – 2000. – 17, N 4. P. 275–289.
5. *Fomina M., Hillier S., Charnock J.M., Melville K., Alexander I.J., Gadd G.M.* Role of oxalic acid overexcretion in transformations of toxic metal minerals by *Beauveria caledonica* // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – 71, N 1. – P. 371–81.
6. *Fomina M., Gadd G.M.* Bioremedial potential of metal transformations by fungi // *Exploitation of Fungi.* – Cambridge: Cambridge University Press, 2007. – P. 236–254.
7. *Fomina M., Charnock J.M., Hillier S., Alvarez R., Livens F., Gadd G.M.* Role of fungi in the biogeochemical fate of depleted uranium // *Cur. Biol.* – 2008. – 18, N 9. – P. R375–R377.
8. *Fomina M., Burford E.P., Hillier S., Kierans M., Gadd G.M.* Rock-building fungi // *Geomicrobiol. J.* – 2010. – 27, N 6–7. – P. 624–629.

9. *Hallberg R., Ferris F.G.* Biomineralization by *Gallionella* // *Geomicrobiol. J.* – 2004. – 21, N 5. – P. 325–330.
10. *Ivarsson M., Holmström S.* The use of ESEM in geobiology // *Scanning Electron Microscopy*. – Shanghai: InTech, 2012 – P. 799–818. Available from: <http://www.intechopen.com/books/scanning-electron-microscopy/the-use-of-esem-in-geobiology>, ISBN: 978-953-51-0092-8.
11. *Little B., Wagner P., Ray R., Pope R., Scheetz R.* Biofilms: an ESEM evaluation of artifacts introduced during SEM preparation // *J. Ind. Microbiol.* – 1991. – 8, N 4. – P. 213–222.
12. *Misirli Z., Oner E.T., Kirdar B.* Real imaging and size values of *Saccharomyces cerevisiae* cells with comparable contrast tuning to two environmental scanning electron microscopy modes // *Scanning*. – 2007. – 29, N 1. – P. 11–9.
13. *Muscariello L., Rosso F., Marino G., Giordano A., Barbarisi M., Cafiero G., Barbarisi A.* A critical overview of ESEM applications in the biological field // *J. Cell Physiol.* – 2005. – 205, N 3. – P. 328–334.
14. *Tai S.S.W., Tang X.M.* Manipulating biological samples for environmental scanning electron microscopy observation // *Scanning*. – 2001. – 23, N 4. – P. 267–272.
15. *Waters M.S., Sturm C.A., El-Naggar M.Y., Luttge A., Udawadia F.E., Cvitkovitch D.G., Goodman S.D., Neilson K.H.* In search for the microbe/mineral interface: quantitative analysis of bacteria on metal surfaces using vertical scanning interferometry // *Geobiology*. – 2008. – 6, N 3. – P. 254–262.

Отримано 20.02.2014