



НАНОСТРУКТУРА БЕЛКОВЫХ КРИСТАЛЛОВ БАКТЕРИЙ *BREVIBACILLUS LATEROSPORUS* NANOSTRUCTURE OF PROTEIN CRYSTALS OF BACTERIA *BREVIBACILLUS LATEROSPORUS*

М.В.Зубашева¹, к.б.н., науч. сотр. лаб. индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов, (ORCID: 0000-0001-7330-7343), Ю.А.Смирнов¹, д.м.н., проф., вед. науч. сотр. лаб. онтогенеза вирусов, (ORCID: 0000-0002-2215-5420), Т.А.Смирнова¹, д.б.н., вед. науч. сотр. лаб. индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов, (ORCID: 0000-0001-7121-635X), Р.Р.Азизбемян⁴, д.б.н., проф., начальник лаб. БАС, (ORCID: 0000-0003-2569-7820), В.Г.Жуховицкий¹, к.м.н., руководитель лаб. индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов, (ORCID: 0000-0002-4653-2446), И.В.Яминский^{2,3,5} д.ф.-м.н., проф. физического и химического факультетов МГУ имени М.В.Ломоносова, вед. научн. сотр. ИНЭОС РАН, директор Энергоэффективных технологий (ORCID: 0000-0001-8731-3947) / yaminskiy@nanoscopy.ru

M.V.Zubasheva¹, Cand. of Sc. (Biology), Yu.A.Smirnov¹, Doct. of Sc. (Medical), Prof., T.A.Smirnova¹, Doct. of Sc. (Biology), R.R.Azizbekyan⁴, Doct. of Sc. (Biology), Prof., V.G.Zhukhovitskiy¹, Cand. of Sc. (Medical), I.V.Yaminskiy^{2,3,5}, Doctor of Sc. (Physics and Mathematics), Prof. of Physical and Chemical departments of Lomonosov Moscow State University, Leader Scientist of INEOS RAS, Director of Energy Efficient Technologies

DOI: 10.22184/1993-8578.2020.13.2.126.131

Получено: 10.03.2020 г.

В работе представлена информация о бактерии *Brevibacillus laterosporus*, способной образовывать белковые кристаллы, токсичные для некоторых насекомых, что позволяет рассматривать данные кристаллы безопасным и экологичным средством для борьбы с москитами. Исследована тонкая структура белковых кристаллов, приведены экспериментальные данные о полученных изображениях методом электронной микроскопии.

The article provides information about bacterium *Brevibacillus laterosporus* capable to form protein crystals, toxic to some insects, which allows us to consider these crystals as safe and environmentally friendly product in the fight against mosquitoes. A fine structure of protein crystals was studied and experimental data of the electron microscopy images were obtained.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в связи с распространенностью заболеваний, передающихся с помощью двукрылых насекомых, особое внимание уделяется биологическим методам борьбы с использованием энтомопатогенных бактерий, главным образом, *Vac. thuringiensis* (*Bt*). Основной вклад в развитие инфекционного процесса

у насекомых при заражении *Bt* вносит белковый кристаллический δ -эндотоксин, синтезирующийся в процессе споруляции [1]. Белковые кристаллы эндотоксина образуются одновременно со спорами по одному, реже по два в каждой бактериальной клетке. Они токсичны для насекомых отрядов чешуекрылых, двукрылых и жесткокрылых.

¹ ФБГУ "Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф.Гамалеи" МЗ РФ, Москва, Россия / FSBI "National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamalei", Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia.

² МГУ имени М.В.Ломоносова, физический и химический факультеты, Москва, Россия / Lomonosov Moscow State University, Physical and Chemical departments, Moscow, Russia.

³ ООО НПП "Центр перспективных технологий", Москва, Россия / Advanced Technologies Center, Moscow, Russia.

⁴ ФГБУ "ГосНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов НИЦ "Курчатовский институт", Москва, Россия / Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow, Russia.

⁵ ИНЭОС РАН, Москва, Россия / INEOS RAS, Moscow, Russia.

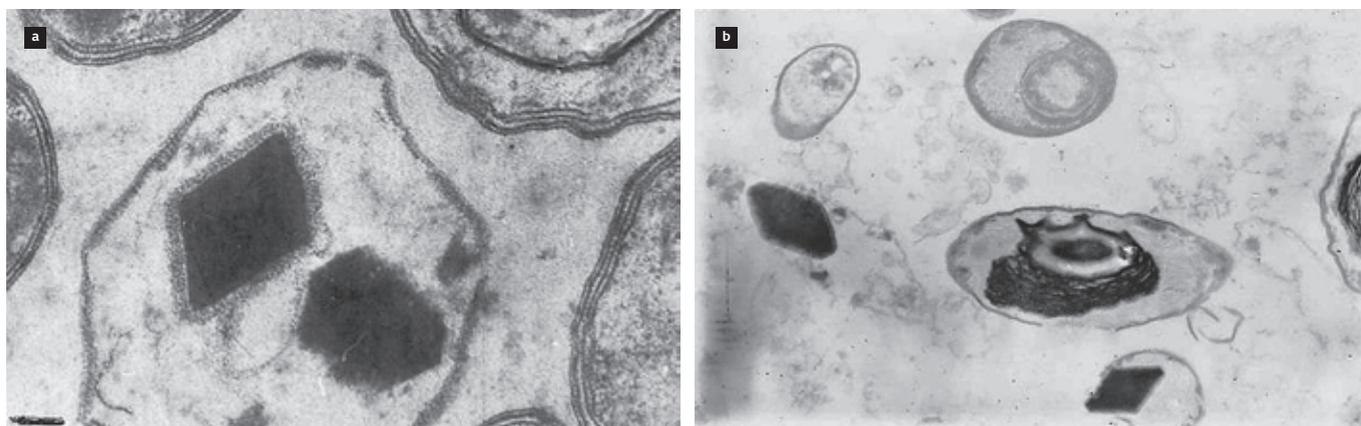


Рис.1. a, b – срезы кристаллов штамма Bl 16-92. Просвечивающая электронная микроскопия
Fig.1. a, b – sections of Bl 16-92 strain crystals. Transmission electron microscopy

Способность к кристаллообразованию у бактерий *Brevibacillus laterosporus* (Bl) до недавнего времени не была установлена. Бациллы Bl, в отличие от *Bt*, относятся к малоизученным энтомопатогенным бактериям. Их особенность в наличии каноевидного включения, прикрепленного к споре.

Ранее нами были получены и охарактеризованы штаммы Bl, способные образовывать параспоральные кристаллы [2]. У исследованных штаммов Bl удалось обнаружить кристаллические включения, различающиеся по форме и размерам, подобные тем, что описаны для энтомопатогенных бактерий *Bt* и *B. sphaericus* [3]. Кристаллы Bl обладают москитоцидными свойствами (токсичны для двукрылых), что важно в связи с возможностью их практического использования в случае развития устойчивости у личинок комаров к имеющимся инсектицидным препаратам на основе *Bt* [4]. Кристаллы Bl мало исследованы. Их сохранение в окружающей среде и проявление

токсичности в организме хозяина зависят от физико-химических свойств, обусловленных их структурной организацией.

Различными микроскопическими методами ранее изучались споры и кристаллы нативных клеток *B. laterosporus*. С помощью атомно-силовой микроскопии получено трехмерное изображение спор [6]. Вид нативного каное дает возможность оценить его позицию по отношению собственно к споре. Однако кристаллы были недостаточно охарактеризованными. В настоящей работе получены данные об ультраструктурной организации кристаллов *B. laterosporus*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы Bl были получены из лабораторной коллекции ВНИИ Генетика (Bl 16-92) и коллекции Института Пастера (Париж) от д-ра Lecadet (*Lat 006*). Штаммы выращивали на агаризованной среде NBY в течение 72 ч при 30 °C.

INTRODUCTION

Currently, due to prevalence of the diseases transmitted by dipterans, special attention is paid to biological methods of combating the use of entomopathogenic bacteria, mainly *Bac. thuringiensis* (*Bt*). The main contribution to the development of the infection process in insects during *Bt* infection is made by crystalline protein δ -endotoxin, synthesized during sporulation [1]. Protein crystals of

endotoxin are formed simultaneously with spores by one or two in each bacterial cell. They are toxic to insects of Lepidoptera, Diptera and Coleoptera orders.

The ability to produce protein crystals in bacteria *Brevibacillus laterosporus* (Bl) has not been established until recently. *Bacilli* Bl, in contrast to *Bt*, are poorly studied entomopathogenic bacteria. Their distinctive feature is the presence of a canoe-like inclusion attached to the spore.

Earlier, we obtained and characterized Bl strains capable to form the parasporal crystals [2]. In the studied Bl strains it was possible to detect the crystalline inclusions that differ in shape and size, similar to those described for the entomopathogenic bacteria *Bt* and *B. sphaericus* [3]. Bl crystals possess mosquito-cidal properties (toxic for dipterans), which are important due to a possibility of their practical

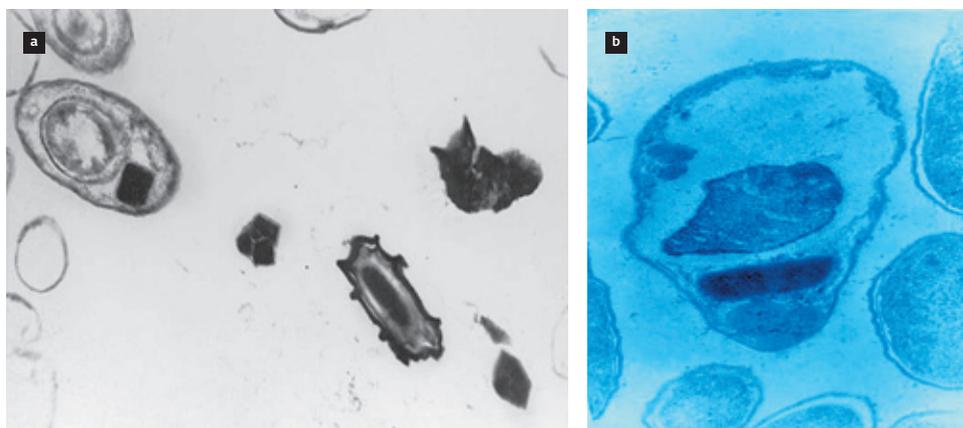


Рис. 2. а, б – срезы кристаллов штамма *Lat 006*. Просвечивающая электронная микроскопия

Fig. 2. a, b – sections of *Lat 006* strain crystals. Transmission electron microscopy

Электронная микроскопия. Споры и кристаллы смывали с агара, суспендировали, промывали в дистиллированной воде и исследовали методами ультратонких срезов и негативного контрастирования [2]. Суспензию спор и кристаллов для изучения методом негативного контрастирования наносили на сетки, покрытые углеродной пленкой и окрашивали контрастером фосфорно-вольфрамовой кислоты NANOWtm. Структура образцов изучена с помощью электронных микроскопов JEM-100B и LEO912AB (Zeiss). Параметры решетки кристалла *BL 16-92* были определены по полученной дифракционной картине с помощью просвечивающего электронного микроскопа LEO912AB (Zeiss).

Кристаллы, в основном, имеют ромбовидную форму (рис. 1a, b). У штамма *Lat 006* кристаллы имеют кубическую форму (рис. 2a) или вытянутую форму с закругленными концами (рис. 2b). Кристаллы окружены сетчатой оболочкой равномерной толщины, особенно хорошо видной у штамма *BL 16-92* (рис. 1a).

При негативном контрастировании у штамма *BL 16-92* также видны ромбические кристаллы с четко очерченными углами размером, в основном, $0,4 \times 0,3$ мкм. Штамм *Lat 006* имеет прямоугольные кристаллические включения размером $0,2 \times 0,7$ мкм или квадратные со сглаженными углами кристаллы размером $0,4 \times 0,4$ мкм и меньше. Встречаются кристаллы менее правильной формы.

use in case of the development of resistance in mosquito larvae to existing BT-based insecticides [4]. *Bl* crystals have been poorly studied. Their conservation in the environment and the manifestation of toxicity in the host organism are dependent on the physical and chemical properties according to their structural organization.

Earlier various microscopic methods have been used to study spores and crystals of native *B. latrosporus* cells. Using atomic force microscopy, a three-dimensional image of spores was obtained [6]. A view of the native canoe makes

it possible to evaluate its position in relation to the spore. However, the crystals were not sufficiently characterized. In this work we obtained data on the ultrastructural organization of the *B. latrosporus* crystals.

MATERIALS AND RESEARCH METHODS

Strains *Bl* were obtained from the laboratory collection of the All-Russian Research Institute of Genetics (*Bl 16-92*) and the collection of the Pasteur Institute (Paris) by Dr. Lecadet (*Lat 006*). Strains were grown on NBY agar medium for 72 hours at 30 °C.

Обработка изображения проведена в программном обеспечении "ФемтоСкан Онлайн" (Центр перспективных технологий, РФ) [7, 8, 9, 10].

РЕЗУЛЬТАТЫ

У штаммов *Bl 16-92*, *Lat 006* были обнаружены кристаллические включения, различающиеся по форме и размерам. На рис. 1a, b и рис. 2a, b представлены данные, полученные при изучении ультратонких срезов этих штаммов. Кристаллы хорошо видны на срезах спорующих клеток. У штамма *Bl 16-92* кри-

Electron microscopy. Spores and crystals were washed off agar, suspended, washed in distilled water, and examined using ultrathin sections and negative contrast [2]. A suspension of spores and crystals for studying by the method of negative contrasting was applied to grids coated with a carbon film and stained with a NANOWtm phosphoric-tungsten acid contrast. The structure of the samples was studied using electron microscopes JEM-100B and LEO912AB (Zeiss). The lattice parameters of the *BL 16-92* crystal were determined from the obtained

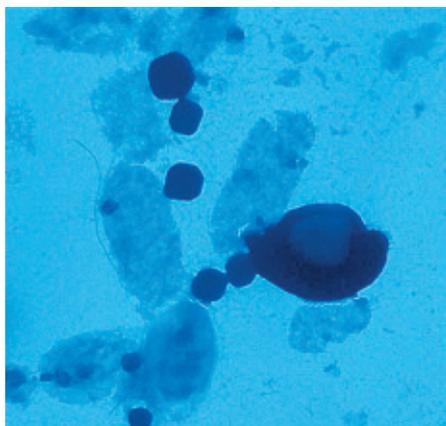


Рис.3. Изображение споры *B. laterosporus* Lat 006, фрагментов разрушенных клеток и кристаллических включений. Просвечивающая электронная микроскопия, микроскоп LEO912AB. Обработка изображения в программном обеспечении "ФемтоСкан Онлайн"

Fig.3. Image of *B. laterosporus* Lat 006 spore, fragments of destroyed cells and crystalline inclusions. Transmission electron microscopy, LEO912AB microscope. Image processing in FemtoScan Online software

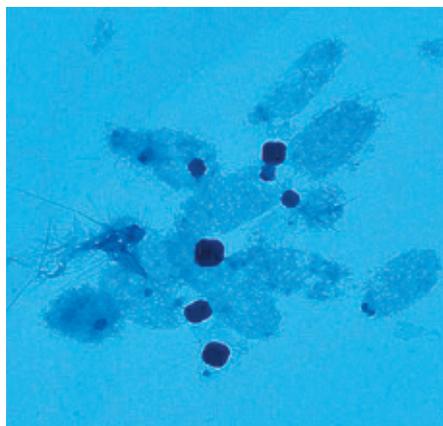


Рис.4. Изображение кристаллов и фрагментов разрушенных клеток штамма Lat 006. Просвечивающая электронная микроскопия, микроскоп LEO912AB. Обработка изображения в программном обеспечении "ФемтоСкан Онлайн"

Fig.4. Image of crystals and fragments of destroyed cells of Lat 006 strain. Transmission electron microscopy, microscope LEO912AB. Image processing in FemtoScan Online software

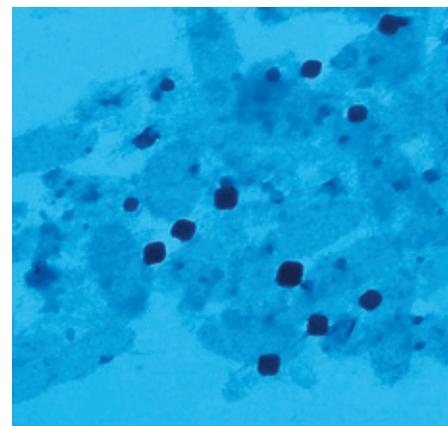


Рис.5. Белковые кристаллы на фоне разрушенных клеток *B. laterosporus* Lat 006. Просвечивающая электронная микроскопия, микроскоп LEO912AB. Обработка изображения в программном обеспечении "ФемтоСкан Онлайн"

Fig.5. Protein crystals on the background of *B. laterosporus* Lat 006 destroyed cells. Transmission electron microscopy, microscope LEO912AB. Image processing in FemtoScan Online software

Кристаллы штамма *Lat 006* отличаются от кристаллов штамма *B1 16-92* не только формой, но и большей электронной плотностью. Однако они сходны с кристаллами *B1 16-92* наличием оболочки, изолирующей их от воздействия факторов внешней среды.

При негативном контрастировании особенно четко выявляются электронно-плотные кристаллы *Lat 006* (рис.3, 4, 5).

На поверхности белкового кристалла наблюдается периодическое упорядочение молекул.

diffraction pattern using a LEO912AB transmission electron microscope (Zeiss).

Image processing was carried out in FemtoScan Online software (Advanced Technologies Center, RF) [7, 8, 9, 10].

RESULTS

In strains *B1 16-92*, *Lat 006* crystalline inclusions were found that differ in shape and size. Fig.1a, b and Fig.2a, b show the data obtained by studying ultrathin sections of these strains. The crystals are clearly visible in sections of sporulating cells. In strain *B1 16-92* the crystals mainly

have a rhomboid shape (Fig.1a, b). In strain *Lat 006* the crystals have a cubic shape (Fig.2a) or an elongated shape with rounded ends (Fig.2b). The crystals are surrounded by a mesh shell of uniform thickness, which is especially clearly visible in strain *B1 16-92* (Fig.1a).

With negative contrast, the rhombic crystals with clearly defined angles, mainly $0.4 \times 0.3 \mu\text{m}$, are also visible in strain *B1 16-92*. Strain *Lat 006* has rectangular crystalline inclusions of size $0.2 \times 0.7 \mu\text{m}$ or square crystals with smoothed corners of size $0.4 \times 0.4 \mu\text{m}$ or less. Crystals

of less regular shape are occur from time to time.

Crystals of strain *Lat 006* differ from crystals of strain *B1 16-92* not only in shape but also in higher electron density. However, they are similar to *B1 16-92* crystals by presence of a shell that isolates them from the influence of environmental factors.

With negative contrasting, the electron-dense *Lat 006* crystals are especially clearly detected (Figs.3, 4, 5).

Periodic ordering of molecules is observed on the protein crystal surface. Fig.6 shows a characteristic image of a fragment of the

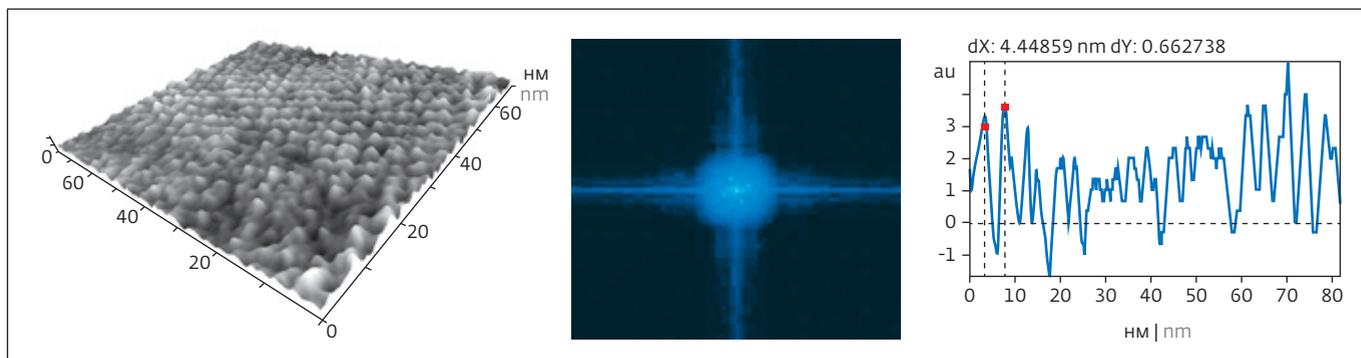


Рис.6. Просвечивающая электронная микроскопия поверхности белкового кристалла: слева – изображение фрагмента поверхности, перепады по высоте соответствуют вариациям электронной плотности; в центре – Фурье-образ участка поверхности (значения в $1/\text{нм}$); справа – поперечное сечение вдоль одной из кристаллографических осей кристалла (по вертикали – относительные единицы). Обработка данных в программном обеспечении "ФемтоСкан Онлайн"

Fig.6. Transmission electron microscopy of a protein crystal surface the surface of a protein crystal: at left is the image of a fragment of the surface, differences in height correspond to variations in electron density; middle image is Fourier transform of the surface area (values in $1/\text{nm}$); at right is a cross section along one of the crystallographic axes of the crystal (vertical: relative units). Data processing in FemtoScan Online software

На рис.6 приведено характерное изображение фрагмента поверхности белкового кристалла, полученное методом просвечивающей электронной микроскопии. Для кристалла характерна кубическая упаковка с периодом около 4,5 нм.

Для сравнения ранее нами исследовались инсектицидные кристаллы *Bt var. galleriae* методом негативного контрастирования, токсичных для чешуекрылых насекомых, и была обнаружена параллельная исчерченность поверхности кристаллов с периодом около 20 нм [5]. Этим методом

были изучены и кристаллы *Bt var. israelensis*, обладающие москитоцидной активностью. При электронной микроскопии этих кристаллов, негативно окрашенных 2%-ным молибдатом аммония, на поверхности наблюдали решетку из частых поперечных линий с периодом 7 нм. У кристаллов, токсичных для двукрылых, не удавалось выявить исчерченность, характерную для кристаллов, токсичных для чешуекрылых.

Проекционное изображение одиночного кристалла клеток *B. laterosporus* Lat 006, полученное

protein crystal surface obtained by transmission electron microscopy. A cubic packing with a period of about 4.5 nm is characteristic of this crystal.

For comparison, we previously studied the insecticidal crystals of *Bt var. galleriae* with the method of negative contrast, toxic to lepidopteran insects, and a parallel striation of the crystal surface with a period of about 20 nm was found [5]. The same method was applied for studying *Bt var. israelensis* crystals that possess mosquitocidal activity. Electron microscopy of these crystals, negatively stained with 2%

ammonium molybdate, showed a lattice of frequent transverse lines with a period of 7 nm on the surface. In the crystals toxic to dipterans, it was not possible to reveal the striation characteristic of crystals toxic to lepidopteran.

The projection image of a single crystal of *B. laterosporus* Lat 006 cells obtained with a LEO 912AB transmission electron microscope is shown in Fig.7.

CONCLUSIONS

In this work we obtained data on the ultrastructural organization of *B. laterosporus* crystals.

Their structure turned out to be similar in size to the crystal lattice with *Bt var. israelensis* crystals toxic to mosquito larvae. Regardless of the type of bacillus, the structural features of crystals are probably more determined by the properties of the object of their insecticidal action.

The characteristic packing size of proteins in *B. Laterosporus* crystals is about 4.5 nm. Crystal sizes vary between 50–700 nm. In this case, a cubic crystal with a facet of 250 nm contains about 170 thousand protein subunits. ■

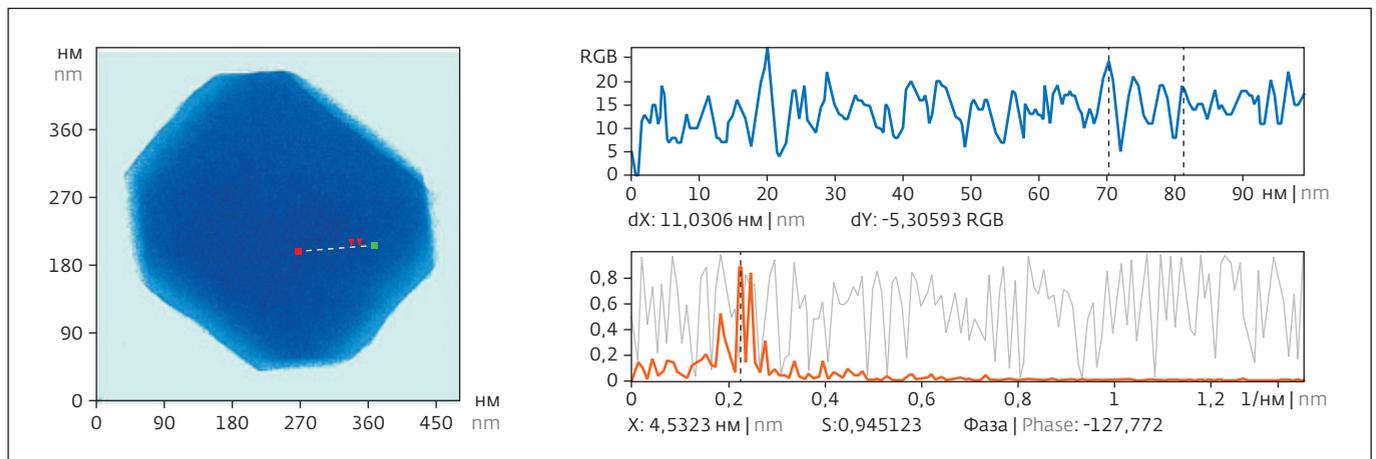


Рис. 7. Изображение (слева) одиночного кристалла клеток *B. laterosporus* Lat 006. Просвечивающая электронная микроскопия, микроскоп LEO912AB. Поперечное сечение вдоль выбранной на изображении линии (вверху справа) и спектральные составляющие сечения (внизу справа). Расстоянию между пунктирными линиями на сечении соответствуют три элементарных ячейки (~11 нм). Максимальное значение в спектре указывает на период в ~4,5 нм

Fig. 7. Image (left) of a single crystal of *B. laterosporus* Lat 006 cells. Transmission electron microscopy, LEO912AB microscope. The cross section along the lines (right upper) selected in the image and the spectral components of the cross section (right bottom). Three unit cells (~11 nm) correspond to the distance between the dashed lines in the cross section. The maximum value in the spectrum indicates a period of ~4.5 nm

на просвечивающем электронном микроскопе LEO 912AB, представлено на рис. 7.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе получены данные об ультраструктурной организации кристаллов *B. laterosporus*. Их структура оказалась сходной по размерам кристаллической решетки с кристаллами *Bt var. israelensis*, токсичными для личинок комаров. Независимо от принадлежности к виду бацилл особенности строения кристаллов вероятно в большей степени определяются свойствами объекта их инсектицидного действия.

Характерный размер упаковки белков в кристаллах *B. laterosporus* – около 4,5 нм. Размеры кристаллов варьируются в пределах 50–700 нм. При этом кристалл кубической формы с гранью в 250 нм содержит в себе около 170 тыс. белковых субъединиц.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Schnepf E., Crickmore N., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Feitelson J., Zeigler D.R., Dean D.H. Bac. thuringiensis and its pesticidal crystal proteins // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1998. Vol. 62. P. 775–806.
2. Smirnova T.A., Minenkova I.B., Orlova M.V., Azizbekyan R.R., Lecadet M. The crystal-forming strains of bacillus laterosporus // *Research in Microbiology*. 1996. Vol. 147. No. 5. P. 343–350.
3. Charles J-F., Nielsen-LeRoux C. and Delecluse A. Bacillus sphaericus toxins: molecular biology and mode of action // *Annu. Rev. Entomol.* 1996. Vol. 41. P. 451–472.
4. Orlova M.V., Smirnova T.A., Azizbekyan R.R., Ganushkina L.A., Yacubovich V.Y. Insecticidal activity of bacillus laterosporus. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998. Vol. 64. No. 7. P. 2723–2725.
5. Smirnova T.A., Mikhailov A.M., Tiurin V.S., Azizbekian R.R. Ultrastructure of the bacterial spores and crystals of various Bacillus huringiensis serotypes // *Mikrobiologiya*. 1984. No. 53. P. 455–462.
6. Zubasheva M., Sagitova A., Smirnov Yu., Smirnova T., Azizbekyan R., Zhukhovitsky V., Yaminsky I. Ultrastructural analysis of Brevibacillus laterosporus bacterial cells using electron and atomic force microscopy // *NANOINDUSTRY*. 2017. No. 2 (72). P. 74–78.
7. Yaminsky I., Filonov A., Sinitsyna O., Meshkov G. FemtoScan Online software // *NANOINDUSTRY*. 2016. No. 2(64). P. 42–46.
8. Akhmetova A., Yaminsky I. 20 years since FemtoScan shows atoms // *NANOINDUSTRY*. 2017. No. 2(72). P. 88–89.
9. Filonov A., Yaminsky I., Akhmetova A., Meshkov G. FemtoScan Online. Why? // *NANOINDUSTRY*. 2018. Vol. 11. No. 5(84). P. 336–342.
10. Yaminsky I.V., Akhmetova A.I., Meshkov G.B. FemtoScan Online Software and Visualization of Nano-Objects in High-Resolution Microscopy // *NANOINDUSTRY*. 2018. Vol. 11. No. 6 (85). P. 414–416.