



УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ BREVIBACILLUS LATEROSPORUS МЕТОДАМИ ЭЛЕКТРОННОЙ И АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

ULTRASTRUCTURAL ANALYSIS OF BREVIBACILLUS LATEROSPORUS BACTERIAL CELLS USING ELECTRON AND ATOMIC FORCE MICROSCOPY

УДК 578.2, ВАК 05.11.13, DOI: 10.22184/1993-8578.2017.72.2.74.78

М.Зубашева¹, А.Сагитова^{2,3}, Ю.Смирнов¹, Т.Смирнова¹, Р.Азизбекян⁴, В.Жуховицкий¹, И.Яминский^{2,3}
 M.Zubasheva¹, A.Sagitova^{2,3}, Yu.Smirnov¹, T.Smirnova¹, R.Azizbekyan⁴, V.Zhukhovitsky¹, I.Yaminsky^{2,3}

Представлены экспериментальные данные электронной и атомно-силовой микроскопии спор *Brevibacillus laterosporus*. Определены размер и строение спор и входящих в их состав каноевидных включений. Штаммы *Brevibacillus laterosporus*, обладающие инсектицидными свойствами, могут применяться для борьбы с переносчиками заболеваний, передаваемых через укусы насекомых.

The article presents experimental data of the electron and atomic force microscopy of *Brevibacillus laterosporus* spores. The size and structure of the spores and canoe-shaped inclusions are determined. *B. laterosporus* strains with insecticidal properties can be used for the prevention of infectious diseases transmitted by insect bites.

Вrevibacillus laterosporus (*B. laterosporus*) относится к бациллам с инсектицидными свойствами. Особый интерес представляют штаммы *B. laterosporus*, образующие москитоцидные кристаллы [1, 2]. Известно, что для этого вида бацилл характерны уникальные каноевидные включения, прикрепленные к споре [3]. Ранее авторами были исследованы различные кристаллоносные штаммы *B. laterosporus* методами просвечивающей и сканирующей электронной микроскопии [1, 4, 5, 6].

В отличие от некоторых других бацилл, в том числе энтомопатогенных, споры *B. laterosporus* лишены экзоспориума. Методом СЭМ было показано, что такие споры имеют складчатую неровную поверхность. При этом, структура спор *B. laterosporus* штаммоспецифична. Так, у *B. laterosporus* 16-92 спора окружена фибриллярной капсулой, которая отсутствует у других

штаммов. Каноевидное включение имеет у разных штаммов неодинаковый размер и структуру. Кристаллы, продуцируемые *B. laterosporus*, различаются по форме, размерам и биологической активности [5].

Несмотря на интенсивное электронно-микроскопическое изучение морфологии этого вида бацилл, детали ультраструктуры спор и кристаллов исследованы недостаточно из-за невозможности работы с нативным материалом. Как известно, техника пробоподготовки материала в электронной микроскопии включает фиксацию, окрашивание, обезвоживание, заливку в смолу. Эти методы нарушают структурную целостность биологических объектов и не позволяют точно определить их размеры. Альтернативным высокоразрешающим методом изучения нативной ультраструктуры образцов, в том числе бактериальных спор, является атомно-

¹ ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России / Institute of Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya.

² МГУ им. М.В. Ломоносова / Lomonosov Moscow State University.

³ НПП "Центр перспективных технологий" / Advanced Technologies Center.

⁴ ГосНИИгенетика / Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms.

силовая микроскопия, которая позволяет визуализировать архитектуру спор на молекулярном уровне *per se*, без химического и физического воздействий.

В связи с этим представляет интерес сравнительное исследование спор и кристаллов методами электронной и атомно-силовой микроскопии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы *B. laterosporus* были получены из лабораторной коллекции ВНИИ Генетика (16-92) и коллекции Института Пастера (Париж) от д-ра Люкаде (Lat 006). Штаммы выращивали на агаризованной среде NBY в течение 72 ч при 30 °С. Споры и кристаллы для исследований смывали с агара, суспендировали и промывали в дистиллированной воде.

Электронная микроскопия проводилась методами негативного контрастирования и ультратонких срезов, как описано в [7]. К негативному контрастированию суспензию спор и кристаллов готовили двумя способами. В первом случае суспензию наносили на медные сетки, покрытые формваровой пленкой, укрепленной углеродом, и окрашивали 1%-ным водным раствором уранил ацетата. Во втором случае суспен-

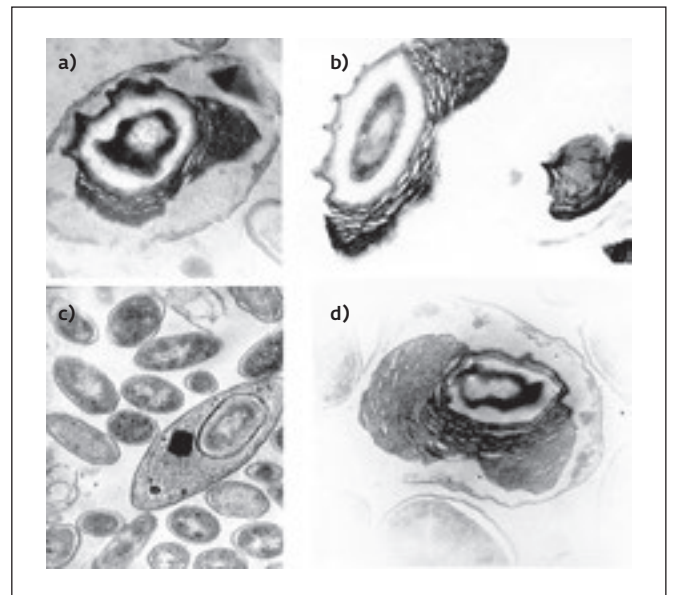


Рис.1. Электронно-микроскопические изображения: а – спорангий штамма *B. laterosporus* 16-92 со спорой и кристаллом; б – зрелая спора штамма *B. laterosporus* 16-92; в – спорангий *B. laterosporus* Lat 006 со спорой и кристаллом; д – зрелая спора *B. laterosporus* Lat 006

Fig.1. Electron microscopic images: a – spore and crystal of strain of *B. laterosporus* 16-92; b – mature spore of strain of *B. laterosporus* 16-92; c – spore and crystal of *B. laterosporus* Lat 006; d – mature spore of *B. laterosporus* Lat 006

Brevibacillus laterosporus (*B. laterosporus*) are bacteria with insecticidal properties. The strains of *B. laterosporus*, forming crystals with anti-mosquito features [1, 2], are of particular interest. It is known that this type of bacillus is characterized by a unique canoe-shaped inclusion attached to the spore [3]. Previously the authors have investigated the different crystalline strains of *B. laterosporus* by transmission and scanning electron microscopy [1, 4, 5, 6].

In contrast to some other bacilli, including entomopathogenic, spores of *B. laterosporus* don't have exosporium. Using SEM it was shown that such spores have folded uneven surface. At the same time, the structure of spores of *B. laterosporus*

is strain-specific. For example, spore of *B. laterosporus* 16-92 is surrounded by a fibrillar capsule, which is absent in other strains. Canoe-shaped inclusion has different size and structure at different strains. The crystals produced by *B. laterosporus* differ in a shape, size and biological activity [5].

Despite intensive electron microscopic studies of the morphology of this type of bacilli, details of the ultrastructure of spores and crystals are poorly studied due to the impossibility of working with the native material. As is known, the technique of sample preparation in electron microscopy includes fixation, coloration, dehydration, filling with resin. These methods violate the structural integrity of biological objects and do not allow to

accurately determine their sizes. Alternative high-resolution method of studying the native ultrastructure of samples, including bacterial spores, is atomic force microscopy that enables to visualize the architecture of spores at the molecular level *per se*, without chemical and physical influences.

In this regard, the comparative study of the spores and crystals by electron and atomic force microscopy are of interest.

MATERIALS AND METHODS

The strains of *B. laterosporus* were obtained from the laboratory collection of the Institute of Genetics (16-92) and collection of the Institut Pasteur (Paris) from Dr. Lecadet (Lat 006). Strains were grown on agar NBY during 72 h at 30 °С. Spores

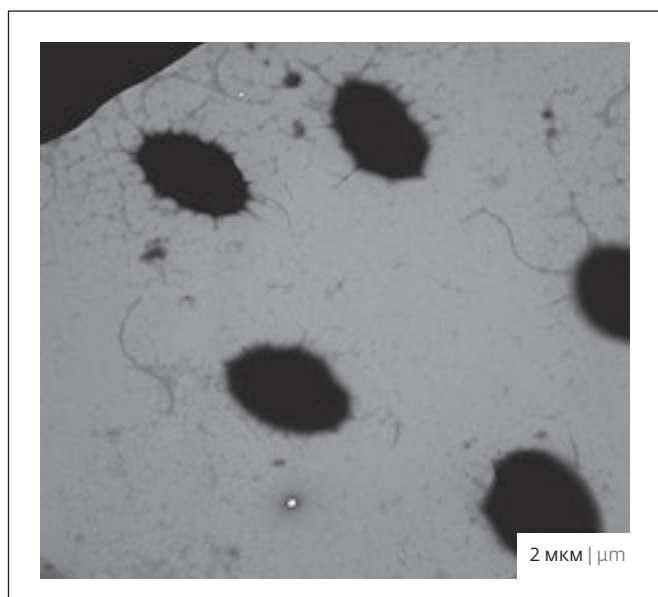


Рис.2. Споры *B. laterosporus* 16-92 (просвечивающий электронный микроскоп LEO912AB)

Fig.2. Spores of *B. laterosporus* 16-92 (LEO912AB transmission electron microscope)

зию наносили на сетки, покрытые углеродной пленкой и окрашивали 2%-ным водным раствором NANOW. Применялись электронные микроскопы JEM-100 B и LEO912AB.

Для атомно-силовой микроскопии был использован многофункциональный СЗМ "ФемтоСкан" [8] и программное обеспечение "ФемтоСкан Онлайн" [9].

and crystals for studies were washed from the agar, suspended and washed in distilled water.

Electron microscopy was carried out by the methods of negative contrasting and ultrathin sections as described in [7]. The suspension of spores and crystals was prepared for negative contrast in two ways. In the first case, the suspension was applied on a copper formvar-coated grids, reinforced with carbon and stained with 1% aqueous uranyl acetate. In the second case, the suspension was applied to a grids covered with carbon film and stained with 2% aqueous solution of NANOW. Electron microscopes

JEM-100 B and LEO912AB were used.

FemtoScan multifunctional scanning probe microscope [8] and FemtoScan Online software [9] were used for atomic force microscopy.

RESULTS

Fine structure of the spores and crystals was previously studied by the method of ultrathin sections [1, 2]. Fig.1a and Fig.1b show spores in the sporangia and free spores. In addition to spores, there is a rhombic crystal in sporangia. Spores are bonded with layered canoe and surrounded by a spore sheath and cortex. Canoe is joined to a spore at one

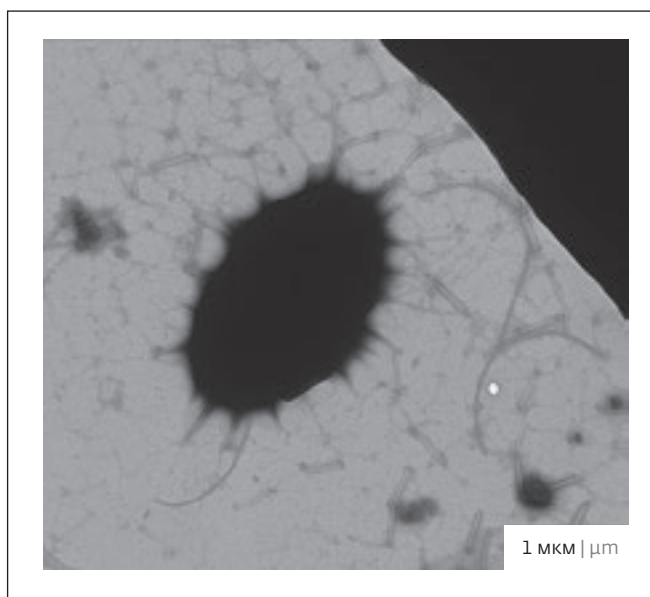


Рис.3. Отдельная спора *B. laterosporus* 16-92 с боковыми выростами (просвечивающий электронный микроскоп LEO912AB)

Fig.3. Separate spore of *B. laterosporus* 16-92 with lateral outgrowths (LEO912AB transmission electron microscope)

РЕЗУЛЬТАТЫ

Тонкая структура спор и кристаллов были изучены ранее методом ультратонких срезов [1, 2]. На рис.1а и 1б представлены споры в спорангии и свободные споры. В спорангии, помимо споры, присутствует ромбовидный кристалл. Споры связаны со слоистым каное, окружены споровой оболочкой и кортексом. Каное примыкает к споре с одной стороны.

side. On the opposite side of spore only folded spore shell is visible. It is evident in the presented images that canoe of strain 16-92 is narrow with tightly packed layers.

Ultrastructure of a strain of *B. laterosporus* Lat 006 has its own features. A cubic crystal is observed in sporangia near the spore (Fig.1c). The mature spores of the strain Lat 006 have a large friable canoe (Fig.1d). Layers of canoe, probably due to the lack of rigidity, are arranged in waves. A lamellar, square crystals with rounded corners are discovered at Lat 006. During lysis the sporangium with canoe-shaped inclusion and crystals are released separately.

На противоположной стороне споры видна только складчатая споровая оболочка. На представленных микрофотографиях видно, что у штамма 16-92 каноз узкое, с плотно уложенными слоями.

Ультраструктура штамма *B. laterosporus* Lat 006 имеет свои особенности. В спорангии рядом со спорой наблюдается кубический кристалл (рис.1с). У зрелых спор штамма Lat 006 обнаружено крупное рыхлое каноз (рис.1d). Слои каноз, видимо из-за отсутствия ригидности, располагаются волнообразно. У Lat 006 обнаружены пластинчатые, квадратные кристаллы со сглаженными углами. При лизисе спорангия споры вместе с канозвидным включением и кристаллы освобождаются раздельно.

На рис.2 представлены изображения электронно-плотных овальных спор *B. laterosporus* 16-92 с каноз-видным включением.

При использовании контрастирования с помощью NANOW на поверхности спор штамма 16-92 удается наблюдать многочисленные длинные тонкие выросты (рис.3), которые отсутствуют у штамма Lat 006 (рис.4). На рис.4 хорошо видно крупное каноз, в которое погружена собственно спора Lat 006. На этом изображении также видны квадратные электронно-плотные кристаллы.

Споры и кристаллы *B. laterosporus* исследованы меньше, чем другие энтомопатогенные бактерии. В особенности это касается каноз, функция которого не определена, и кристаллов, чья активность по отношению к различным биологическим объектам слабо изучена.

Fig.2 presents images of electron-dense oval spores of *B. laterosporus* 16-92 with canoe-shaped inclusion.

When using contrasting by means of NANOW, on a surface of spores of a strain 16-92 it is possible to observe numerous long thin outgrowths (Fig.3) which are absent at a strain Lat 006 (Fig.4). Fig.4 shows a large canoe with submerged spore Lat 006. The square electron-dense crystals are also visible in this image.

Spores and crystals of *B. laterosporus* are studied less than other entomopathogenic bacteria. In particular, it concerns a canoe which function isn't defined, and crystals,

whose activity towards different biological objects is poorly studied.

Three-dimensional image of spore of *B. laterosporus* on the surface of cleaved mica was obtained using a FemtoScan scanning probe microscope (Advanced Technologies Center, Russia). Spores of *B. laterosporus* were studied using the atomic force microscopy (Fig.5). The observed size of the spore was about 1.5 μm . The construction of the image is performed in the FemtoScan Online software [9].

Atomic force microscopy allows to obtain information about three-dimensional topography and to

estimate the volume of spore at her drying in the air.

The strains of *B. laterosporus* are specifically active against the larvae of various dipteran insects, in particular against mosquitoes *An. stephensi* и *Ae. Aegypti*. High biocidal effect (antibacterial, fungicidal, cyanolytic) allows the use of these strains as a producers of biological plant protection from disease and for fight against toxic microscopic algae (blue-green bacteria). ■

The study was performed with financial support of RFBR in the framework of a research project No.15-04-07678.

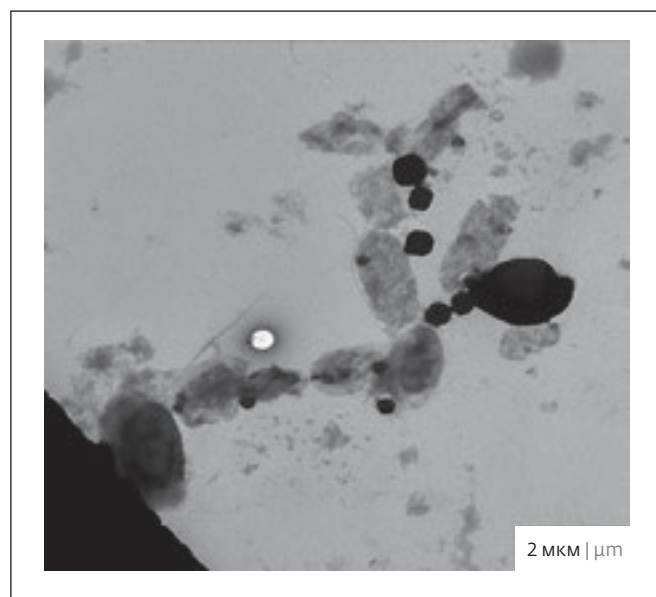


Рис.4. Спора *B. laterosporus* Lat 006 и сопутствующие кристаллы (просвечивающий электронный микроскоп LEO912AB)

Fig.4. Spore of *B. laterosporus* Lat 006 and related crystals (LEO912AB transmission electron microscope)

Трехмерное изображение споры *B. laterosporus*, нанесенной на поверхность свежесколотой слюды, получено с помощью сканирующего зондового микроскопа "ФемтоСкан" (Центр перспективных технологий, РФ). Споры *B. laterosporus* исследованы с помощью метода атомно-силовой микроскопии (рис.5). Наблюдаемый размер споры составил около 1,5 мкм. Построение изображе-

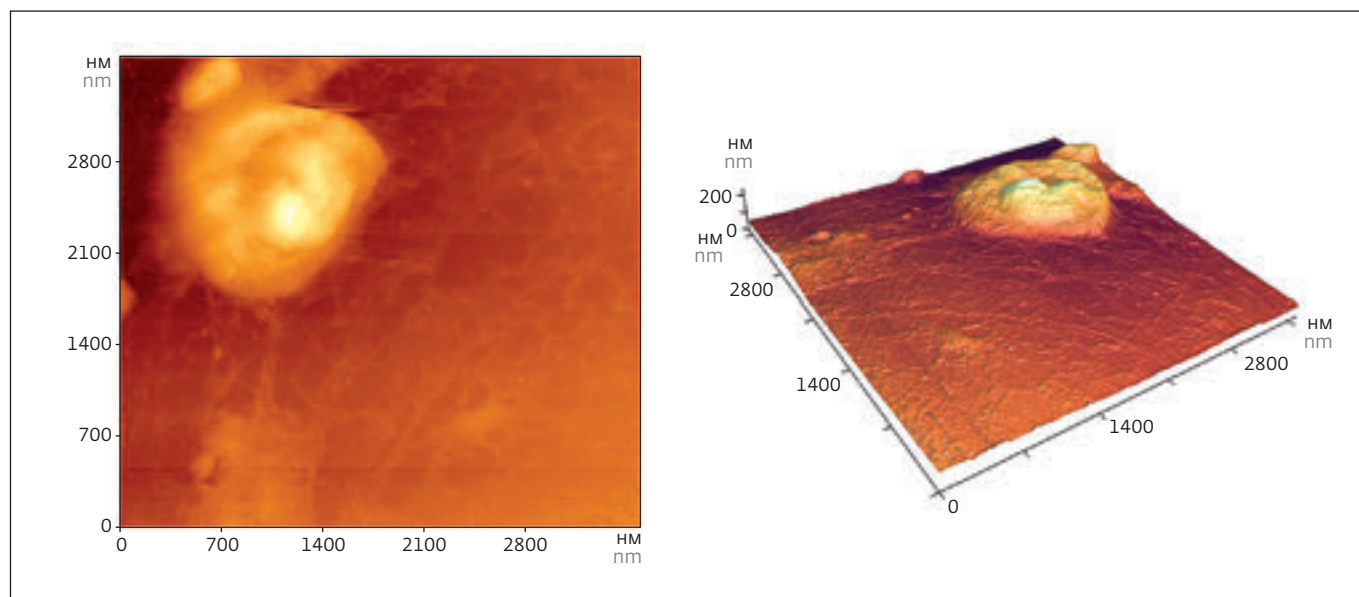


Рис.5. АСМ-изображение споры *B. laterosporus* Lat 006: слева – топография, справа – трехмерный вид (сканирующий зондовый микроскоп "ФемтоСкан")

Fig.5. AFM-image of spore of *B. laterosporus* Lat 006: on left – topography, on right – three-dimensional view (FemtoScan scanning probe microscope)

ния выполнено в программном обеспечении "ФемтоСкан Онлайн" [9].

Атомно-силовая микроскопия позволяет получить данные о трехмерном рельефе, оценить объем споры при ее высушивании на воздухе.

Штаммы *B. laterosporus* специфически активны по отношению к личинкам различных двухкрылых насекомых, в частности, против комаров *An. stephensi* и *Ae. Aegypti*. Высокий биоцидный эффект (антибактериальный, фунгицидный, цианолитический) позволяет использовать эти штаммы в качестве продуцентов биологических средств защиты растений от болезней и для борьбы с токсическими микроскопическими водорослями (сине-зелеными бактериями).

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта 15-04-07678.

ЛИТЕРАТУРА

1. Smirnova T.D., Minenkova I., Orlova M.V., Azizbekyan R.R., Lecadet M. The crystal-forming strains of bacillus laterosporus // *Research in Microbiology*. 1996. Т. 147. № 5. С. 343–350.
2. 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. Т. 64. № 7. С. 2723–2725.
3. Fiz-James P.C., Young I.E. Morphological and chemical studies of the spores and parasporal bodies of *Bacillus laterosporus* // *J. Biochem. Cytol.* 1958. 4, С. 639–649.
4. Zubasheva M.V., Smirnova T.A., Azizbekyan R.R., Ganushkina L.A. Larvicidal activity of crystal-forming strains of *brevibacillus laterosporus* // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2010. Т. 46. № 8. С. 755–762.
5. Смирнова Т.А., Шевлягина Н.В., Николаенко М.А., Сорокин В.В., Зубашева М.В., Азизбекян Р.Р. Характеристика спор и кристаллов *brevibacillus laterosporus* // *Биотехнология*. 2011. № 6. С. 29–37.
6. Смирнова Т.А., Шамшина Т.Н., Константинова Г.Е., Ганушкина Л.А., Кузнецова Н.И., Миненкова И.Б., Николаенко М.А., Азизбекян Р.Р. Штамм *bacillus laterosporus* с множественной биологической активностью // *Биотехнология*. 1993. № 9. С. 11–15.
7. Смирнова Т.А., Зубашева М.В., Шевлягина Н.В., Николаенко М.А., Азизбекян Р.Р. Электронно-микроскопическое исследование поверхности спор бацилл // *Микробиология*. 2013. Т. 82. № 6. С. 698–674.
8. Яминский И. Сканирующий зондовый микроскоп ФемтоСкан: новый инструмент для медицины // *НАНОИНДУСТРИЯ*. 2013. № 5(43). С. 44–46.
9. Yaminsky Y., Filonov A., Sinitsyna O., Meshkov G. FemtoScan Online software // *NANOINDUSTRY*. 2016. N 2(64). P. 42–46.