



Получено: 2.01.2022 г. | Принято: 11.01.2022 г. | DOI: <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2022.15.1.8.16>

Научная статья

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПОВЕРХНОСТИ СПОР *BACILLUS CEREOUS*

Т.А.Смирнова¹, д.б.н., вед. науч. сотр., ORCID: 0000-0001-7121-635X

З.С.Плиева¹, мл. науч. сотр., ORCID: 0000-0001-9765-8623

М.В.Зубашева¹, к.б.н., науч. сотр., ORCID: 0000-0001-7330-7343

А.И.Ахметова^{2,3}, инженер НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ, ведущий специалист Центра перспективных технологий, ORCID: 0000-0002-5115-8030

Ю.А.Смирнов¹, д.м.н., проф., вед. науч. сотр., ORCID: 0000-0002-2215-5420

В.Г.Жуховицкий^{1,4}, к.м.н., руководитель лаб., ORCID: 0000-0002-4653-2446

И.В.Яминский^{2,3} д.ф.-м.н., проф. физического и химического факультетов

МГУ имени М.В. Ломоносова, ORCID: 0000-0001-8731-3947 / yaminsky@nanoscopy.ru

Аннотация. Интерес к спорообразующим бактериям *Bacillus cereus* связан с их широкой распространенностью и способностью вызывать различные заболевания, главным образом желудочно-кишечного тракта. Споры патогенных микроорганизмов, в том числе и *B. cereus*, представляют большую проблему для медицины, фармакологии и пищевой промышленности из-за резистентности к различным факторам внешней среды. Свойства спор обусловлены их ультраструктурой. Базисная структура спор консервативна и состоит из экзоспориума, оболочки, внешней мембраны, кортекса, внутренней мембраны и сердцевины [1]. Однако наружные слои спор, включая экзоспориум, различаются у отдельных видов и штаммов, что позволяет сравнивать особенности их компонентов с помощью электронной микроскопии.

Ключевые слова: спорообразующие бактерии, *Bacillus cereus*, экзоспориум, штамм, споры, электронная микроскопия, ФемтоСкан Онлайн, фурье-фильтрация, метод негативного контрастирования

Для цитирования: Т.А.Смирнова, З.С.Плиева, М.В.Зубашева, А.И.Ахметова, Ю.А.Смирнов, В.Г.Жуховицкий, И.В.Яминский. Структурная организация поверхности спор *Bacillus cereus*. НАНОИНДУСТРИЯ. 2022. Т. 15, № 1. С. 8–16. <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2022.15.1.8.16>

Received: 2.01.2022 | Accepted: 11.01.2022 | DOI: <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2022.15.1.8.16>

Original paper

STRUCTURAL ORGANISATION OF THE SURFACE OF *BACILLUS CEREOUS* SPORES

T.A.Smirnova¹, Doct. of Sci. (Biology), Leading Researcher, ORCID: 0000-0001-7121-635X

Z.S.Plieva¹, Junior Researcher, ORCID: 0000-0001-9765-8623

M.V.Zubasheva¹, Cand. of Sci. (Biology), Scientific Researcher, ORCID: 0000-0001-7330-7343

¹ ФГБУ "Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи" МЗ РФ, Москва, Россия / The National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya of the 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 ФГБОУ ДПО "Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования (РМАНПО)" Минздрава РФ, Москва, Россия / Russian Medical Academy of Continuing Professional Education (RMAPE), Moscow, Russia



A.I.Akhmetova^{2,3}, Engineer of A.N.Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Leading Specialist of Advanced Technologies Center and of Energy Efficient Technologies, ORCID: 0000-0002-5115-8030
Yu.A.Smirnov¹, Doct. of Sci. (Medicine), Prof., Leading Researcher, ORCID: 0000-0002-2215-5420
V.G.Zhukhpvitsky^{1,4}, Cand. of Sci. (Medicine), Head of Laboratory, ORCID: 0000-0002-4653-2446
I.V.Yaminsky^{2,3}, Doct. of Sci. (Physics and Mathematics), Prof. of Lomonosov Moscow State University, Physical and Chemical departments, ORCID: 0000-0001-8731-3947 / yaminsky@nanoscopy.ru

Abstract. The interest in the spore-forming bacteria *Bacillus cereus* is due to their widespread occurrence and their ability to cause various diseases, mainly of the gastrointestinal tract. Spores of pathogenic microorganisms, including *B. cereus*, pose a great challenge to medicine, pharmacology and food industry because of their resistance to various environmental factors. The properties of the spores are determined by their ultrastructure. The basic structure of spores is conservative and consists of the exosporium, shell, outer membrane, cortex, inner membrane and core [1]. However, the outer layers of the spores, including the exosporium, vary between species and strains, allowing the features of their components to be compared by electron microscopy.

Keywords: spore-forming bacteria, *Bacillus cereus*, exosporium, strain, spores, electron microscopy, FemtoScan Online, Fourier-filtering, negative contrast method

For citation: T.A.Smirnova, Z.S.Plieva, M.V.Zubasheva, A.I.Akhmetova, Yu.A.Smirnov, V.G.Zhukhovetsky, I.V.Yaminsky. Structural organisation of the surface of *Bacillus cereus* spores. NANOINDUSTRY. 2022. V. 15, no. 1. PP. 8–16. <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2022.15.1.8.16>

ВВЕДЕНИЕ

Экзоспориум – структура, характерная для спор группы *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, состоит из наружного ворсинчатого слоя, внутреннего паракристаллического, гексагонально перфорированного базального слоя и содержит белки, липиды, полисахариды [2–4]. Экзоспориум имеет длинные выросты, способствующие адгезии спор [5]. Экзоспориум находится от оболочки на значительном расстоянии, например, у *B. anthracis* – 500 нм [3]. Электронно-прозрачная область между базальным слоем экзоспориума и оболочкой спор (промежуточное, экзоспориальное пространство) у некоторых штаммов содержит структуры, образующие дополнительные поверхностные слои. Экзоспориум играет важную роль в резистентности, адгезии, распространении и в прорастании спор. Экзоспориум представляет собой фильтр, который позволяет проникать индукторам прорастания – аланину или инозину, но не протеолитическим ферментам и антигенам [6]. У спор мутанта *B. cereus*, имеющего повышенную устойчивость к лизоциму и измененную способность к прорастанию, образуется двойной экзоспориум [7]. Важным для структурных исследований экзоспориума является его естественная кристаллическая природа. Экзоспориум может быть использован как модель для создания самоорганизующихся надмолекулярных, наноразмерных структур. Показано, что основной белок

INTRODUCTIONS

Exosporium is a structure characteristic of the spores of the *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis* and consists of an outer villous layer, an inner paracrystalline layer, a hexagonally perforated basal layer and contains proteins, lipids and polysaccharides [2–4]. The exosporium has long outgrowths that promote spore adhesion [5]. The exosporium is located at a considerable distance from the shell (e.g. 500 nm in *B. anthracis* [3]). The electron-transparent region between the basal layer of the exosporium and the spore shell (the intermediate exosporial space) in some strains contains structures that form additional surface layers. The exosporium plays an important role in resistance, adhesion, proliferation and spore germination. The exosporium is a filter that allows the germination inducers – alanine or inosine – but not proteolytic enzymes or antibodies, to pass through [6]. The spores of the mutant *B. cereus* which has increased lysozyme resistance and altered germination ability, forms a double exosporium [7]. Important for structural studies of the exosporium is its naturally crystalline nature. Exosporium can be used as a model for creating self-organizing supramolecular, nanoscale structures. It has been shown that the main protein of the ExsY basal layer can assemble into ordered two-dimensional structures that mimic the exosporium. Self-assembly, probably, plays an important role in exosporium construction [8]. Using electron microscopy and computer image analysis, we have previously obtained data on the fine structure of the exosporium of the reference strain *B. cereus* [9].



базального слоя ExsY может собираться в упорядоченные двумерные структуры, которые имитируют экзоспориум. Самосборка, вероятно, играет важную роль в построении экзоспориума [8]. С помощью электронной микроскопии и компьютерного анализа изображений ранее нами были получены данные о тонкой структуре экзоспориума эталонного штамма *B. cereus* [9].

Представляло интерес провести изучение экзоспориума у спор штаммов различного происхождения, природных и клинических изолятов с помощью электронной микроскопии и компьютерного анализа изображений. Исследуемые штаммы до настоящего времени не были изучены. Особое внимание уделено наружным структурам спор *B. cereus* (экзоспориум и экзоспориальное пространство) этих штаммов, их организации как элементов, обеспечивающих свойства поверхности. Целью настоящего исследования является определение параметров решетки базальной мембраны экзоспориума и сравнение поверхностных структур спор штаммов из различных экологических ниш.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы и питательные среды

В работе использовали коллекционный эталонный штамм NCTC 8035 и природные штаммы (115\079, 131\079) *B. cereus*. Штаммы выращивали на агаризованном питательном бульоне LB при 28 °C в течение 96 ч. Клинические изоляты были получены от больных с язвенным колитом (ЯК) из Государственного научного центра колопроктологии им. А. Н. Рыжих МЗ РФ, обозначенные как *B. cereus* SCCC 1208, *B. cereus* SCCC 19/16. Исследовали также следующие штаммы: штамм 169 *B. cereus*, выделенный из отделяемого брюшной полости у больного с ЯК; штамм 177 *B. cereus*, выделенный из просветных фекалий; штамм 172 *B. cereus*, выделенный из просветных фекалий; штамм 214/18 *B. cereus*, выделенный из операционной раны пациента с ЯК; штамм 239/18 *B. cereus*, выделенный из крови пациента с ЯК и подтвержденным диагнозом сепсиса; штамм 223/18 *B. cereus*, выделенный из брюшной полости пациента с ЯК штамм 181 *B. cereus*, выделенный из операционной раны пациента с ЯК. Среда выращивания – кровяной агар.

Прозвучивающая электронная микроскопия

Бактерии через 96 ч культивирования смывали с плотной питательной среды и отмывали дистиллированной водой. Для изучения спор методом негативного контрастирования суспензию спор наносили на медные сетки, покрытые

It was of interest to study exosporium in spores of strains of different origin and natural and clinical isolates by means of electron microscopy and computer image analysis. These strains have not been studied until now. Particular attention is paid to the external structures of *B. cereus* spores (exosporium and exosporium space) of these strains and their organization as the elements providing for surface properties. The aim of the present study is to determine the lattice parameters of the basal exosporium membrane and to compare the surface structures of spores of strains from different ecological niches.

MATERIALS AND METHODS

Strains and nutrient media

A collection reference strain NCTC 8035 and natural strains (115\079, 131\079) of *B. cereus* were used. The strains were grown on LB agarized nutrient broth at 28 °C for 96 hours. Clinical isolates were obtained from patients with ulcerative colitis (UC) treated in A.N.Ryzhikh State Scientific Centre for Coloproctology, (Moscow, Russia) of the Ministry of Health of the Russian Federation, designated as *B. cereus* SCCC 1208, *B. cereus* SCCC 19/16. The following strains were also investigated: strain 169 of *B. cereus* isolated from abdominal secretions of a patient with UC; strain 177 of *B. cereus* isolated from lumen feces; strain 172 of *B. cereus* isolated from lumen feces; strain 214/18 of *B. cereus* isolated from the operative wound of a patient with UC; strain 239/18 of *B. cereus* isolated from the blood of a patient with confirmed sepsis; strain 223/18 of *B. cereus* isolated from the blood of a patient with UC; strain isolated from the operative wound of a UC patient; strain 239/18 *B. cereus* isolated from the blood of a UC patient with a confirmed diagnosis of sepsis; strain 223/18 *B. cereus* isolated from the abdominal cavity of a UC patient strain 181 *B. cereus* isolated from the operative wound of a UC patient. The growth medium was blood agar.

Transmission electron microscopy

After 96 hours of cultivation the bacteria were washed off the nutrient-dense medium and washed out with distilled water. To study spores by negative contrast, the spore suspension was applied to copper grids covered with a formvar film and stained with 1% aqueous uranyl acetate solution or 2% aqueous ammonium molybdate solution. To obtain ultrathin sections, the samples were fixed using the Ito-Karnowski method [10]. The material was then fixed in 1% OsO₄ solution on 0.2 M cacodylate buffer and in 1% uranyl acetate solution on 0.2 M maleate buffer. The material was dehydrated in alcohols with concentrations of 50°, 70°, 96°, and 100°. The material was then placed in a 100° alcohol mixture with LR White resin and then in pure LR White resin. The material was transferred to gelatin capsules which were placed in a thermostat at 56 °C. Sections were obtained on an LKB III ultratome (LKB, Sweden) and contrasted with a



формваровой пленкой, и окрашивали 1% водным раствором уранилацетата или 2% водным раствором молибдата аммония. Для получения ультратонких срезов образцы фиксировали по методу Ито-Карновски [10]. Затем материал фиксировали в 1% OsO₄ растворе на 0,2 М какодилатном буфере и в 1% растворе уранилацетата на 0,2 М малеатном буфере. Материал обезвоживали в спиртах с концентрациями 50°, 70°, 96°, 100°. Далее помещали в смесь 100° спирта со смолой LR White, а затем в чистую смолу LR White. Материал переносили в желатиновые капсулы, которые помещали в термостат при 56 °С. Срезы получали на ультратоме LKB III (LKB, Sweden) и контрастировали 1% раствором уранилацетата в 70° спирте и лимоннокислым свинцом. Негативно окрашенные споры и срезы изучали в электронном микроскопе JEM 2100 (Jeol, Japan) при ускоряющем напряжении 160 кВ. Анализ изображений проводился с помощью программного обеспечения "ФемтоСкан Онлайн" (Центр перспективных технологий, Москва, www.nanoscopy.ru) [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Методами негативного контрастирования и ультратонких срезов было проведено электронно-микроскопическое изучение спор эталонного, природных штаммов и клинических изолятов *B. cereus*. На рис.1-7 представлены зрелые споры эталонного штамма 8035, природных штаммов и клинических изолятов *B. cereus*. Эталонный штамм 8035 имеет характерную для *B. cereus* ультраструктуру (рис.1).

На поперечном срезе представлены следующие структуры: экзоспориум в виде электронно-плотного наружного слоя, электронно-прозрачное экзоспориальное пространство, отделяющее экзоспориум от споровой электронно-плотной оболочки, электронно-прозрачный кортекс, сердцевина в центре споры. Эти результаты дают общее представление о строении споры *B. cereus*. Все исследованные штаммы (природные и клинические изоляты) имели сходную базисную ультраструктуру, но и свои особенности. У споры природного штамма *B.cereus* 131 на поперечном срезе в экзоспориальном пространстве обнаруживаются множественные мембранные включения, повторяющие ход экзоспориума (рис.2).

У клинического изолята *B.cereus* 19 на продольном срезе видно, что спора находится на одном полюсе экзоспориума, свободно прилегающего чехла, а большая часть его внутреннего электронно-прозрачного пространства заполнена хаотично расположенными фрагментами мембранных структур (рис.3).

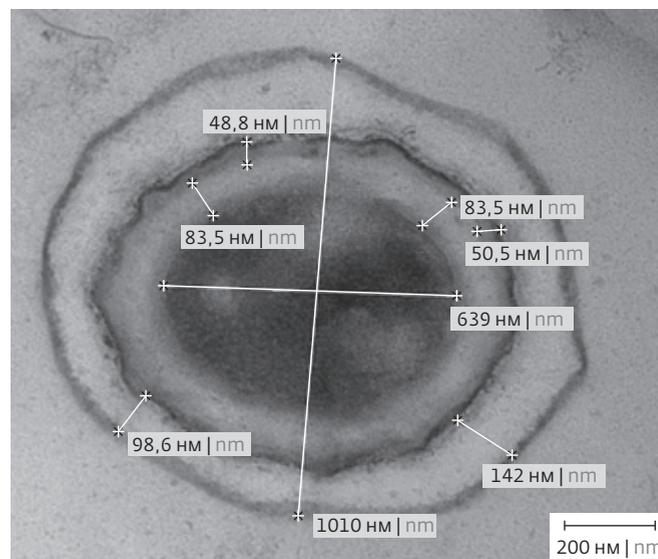


Рис.1. Ультраструктура споры *B. cereus* 8035 с размерами: экзоспориальное пространство – 98–142 нм, оболочка – 50,5 нм, кортекс – 835 нм, сердцевина – 690 нм
Fig.1. Ultrastructure of the *B. cereus* spore 8035 with dimensions: exosporous space 98–142 nm, shell 50.5 nm, cortex 835 nm, medulla 690 nm

1% solution of uranyl acetate in 70° alcohol and citric acid lead. Negatively stained spores and sections were studied in a JEM 2100 electron microscope (Jeol, Japan) at an accelerating voltage of 160 kV. Image analysis was performed using FemtoScan Online software (Center for Advanced Technologies, Moscow, www.nanoscopy.ru) [11].

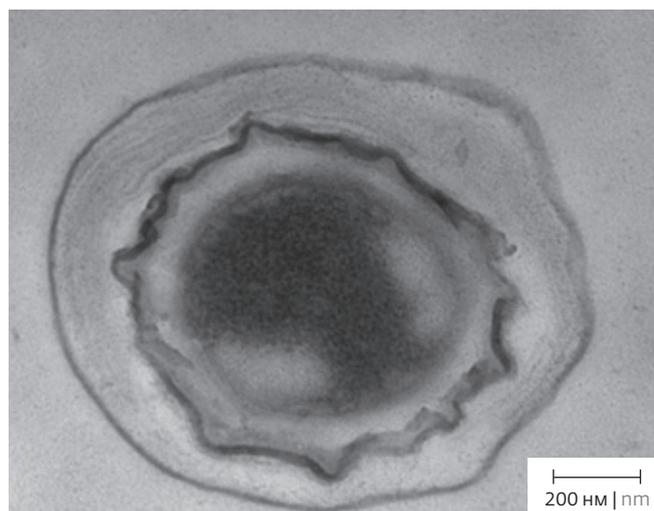


Рис.2. Изображение споры штамма *B. cereus* 131. Различимы множественные мембранные включения, по форме аналогичные экзоспориуму
Fig.2. Image of a spore of strain *B. cereus* 131. Multiple membrane inclusions similar in shape to the exosporium are visible

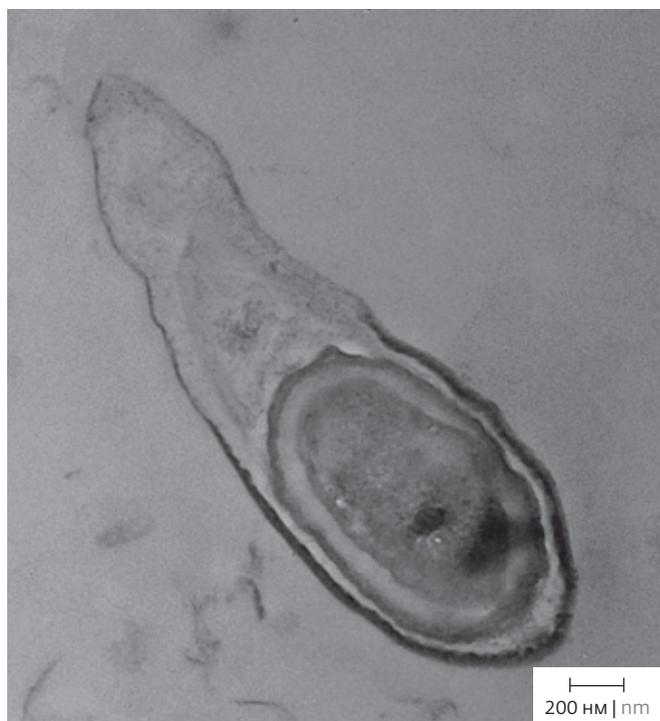


Рис.3. Изображение споры штамма *B. cereus* 19. Отличительная черта – характерное распределение споры в одной части экзоспориума

Fig.3. Image of a spore of strain *B. cereus* 19. Distinctive feature – characteristic spore distribution in one part of the exosporium

На поперечных срезах спор клинических изолятов видно, что экзоспориальное пространство содержит структуры, отсутствующие у спор эталонного штамма. На рис.4 а, б, с виден дополнительный слой второго экзоспориума у клинических изолятов 214, 177, 239.

Таким образом обнаружено, что поверхностные слои спор природных штаммов и клинических изолятов утолщены и, возможно, менее проницаемы, чем у эталонного штамма. Такая особенность может защищать спору от различных бактерицидных факторов. В случае природных штаммов это могут быть погодные воздействия, а клинические изоляты должны противостоять защитным антибактериальным механизмам хозяина. Эталонный штамм 8035, выращиваемый в лабораторных условиях, не подвергается таким воздействиям и имеет более упрощенную поверхность спор.

Методом негативного контрастирования было также проведено электронно-микроскопическое изучение спор клинических и природных изолятов. На рис.5, 6 представлены споры и их фрагменты, негативно контрастированные 2% молибдатом аммония. Ранее методом негативного

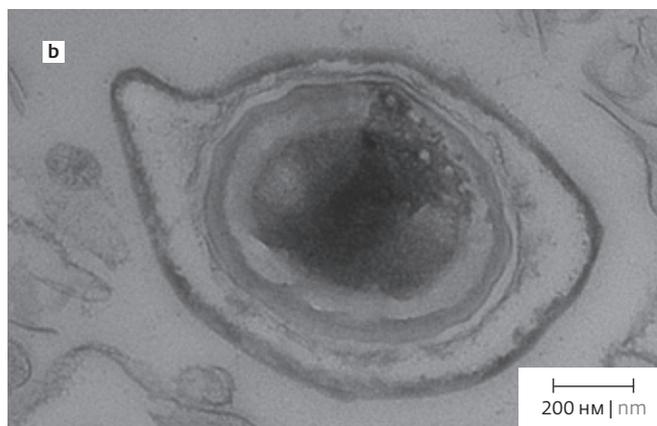
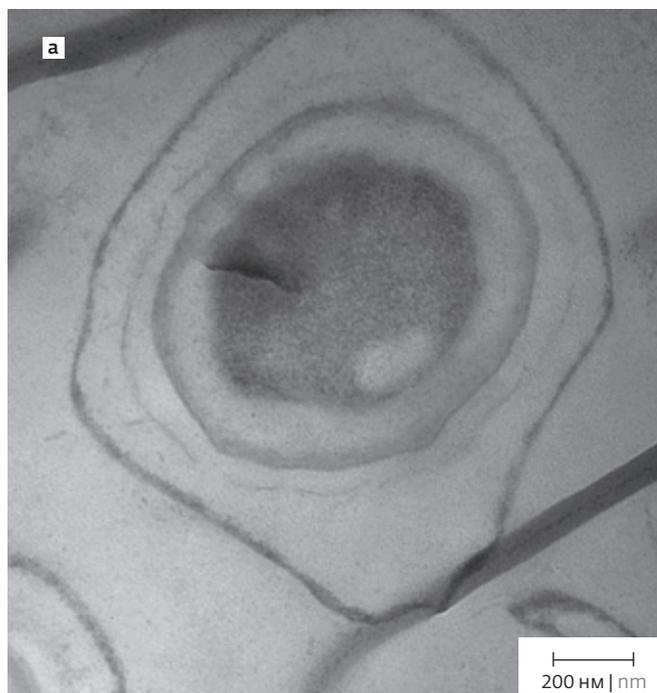


Рис.4. Изображение второго слоя экзоспориума на поперечном срезе спор клинических штаммов *B. cereus* а – 214, б – 177, с – 239

Fig.4. Image of the second exosporium layer on a cross-section of spores of *B. cereus* clinical strains: a – 214, b – 177, c – 239

RESULTS

Electron microscopic examination of the spores of the reference strain, natural strains and clinical isolates of *B. cereus* was carried out using negative contrast and ultra-thin sections. Figures 1-7 show mature spores of the reference strain 8035, natural strains and clinical isolates of *B. cereus*. The reference strain 8035 has an ultrastructure characteristic of *B. cereus* (Fig.1).

A cross section shows the following structures: the exosporium as an electron-dense outer layer, the electron-transparent exosporial space separating the exosporium from the electron-dense spore shell, the

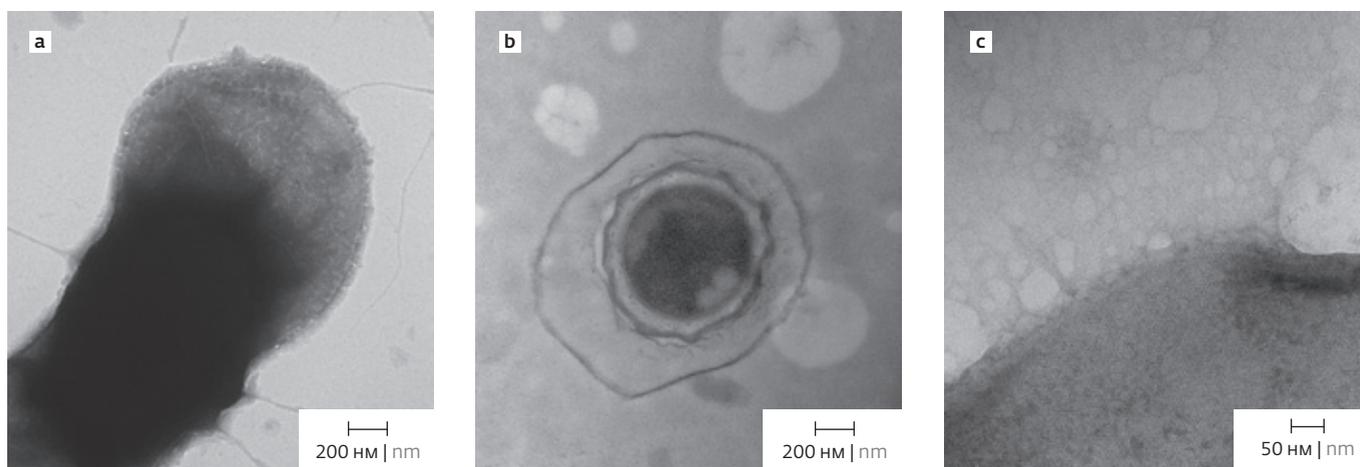


Рис.5. Изображение участка экзоспориума *B. cereus*: а – штамма 114, б – штамма 115, с – штамма 239

Fig.5. Image of the exosporium section of *B. cereus* a – strain 114, b – strain 115, c – strain 239

контрастирования исследовали споры эталонного штамма 8035 [9].

Экзоспориум исследованных спор штаммов, как и у штамма 8035, выявлялся в виде электронно-прозрачного двуслойного мешка, окружающего электронно-плотную спору. Для выявления ультраструктуры исследовали периферическую область экзоспориума. На рис.5 представлены участки экзоспориума у природных штаммов *B. cereus* 114 и 115 с хорошо различимыми ворсинчатым и базальными слоями, а также аналогичный участок экзоспориума у клинического изолята 239. На поверхности спор штаммов 114 и 115 видны длинные споровые выросты.

При большом увеличении на всех снимках видна гексагональная упаковка субъединиц базальной мембраны. Однако структура этой мембраны видна не отчетливо.

Для получения четкой картины экзоспориума спор эталонного штамма 8035 ранее применили фурье-фильтрацию и получили свободное от шумов изображение, на котором видна гексагональная упаковка и отверстия. Аналогичная работа проведена с экзоспориумом штамма 239 (рис.6). Измерение периода рефлексов не выявило значительных изменений расстояния между порами в гексагональной упаковке экзоспориума штамма 239 по сравнению с эталонным штаммом: у штамма 8035 длина составляла 5,6 нм, 6,2 нм, 4,7 нм. На рис.6с длина составляет 5,2 нм, 5,5 нм, 5,8 нм. Среднее значение одинаково для эталонного штамма и штамма 239–5,5 нм.

На рис.7 показан однослойный фрагмент экзоспориума клинического изолята *B.cereus* 214, демонстрирующий сходство с экзоспориумом другого клинического изолята *B.cereus* 239.

electron-transparent cortex, and the core at the centre of the spore. These results provide an overview of the spore structure of *B. cereus*. All the strains studied (natural and clinical isolates) had a similar basic ultrastructure, but also had their own specific features. In the spore of the natural strain *B. cereus* 131, a cross-section of the exosporium shows multiple membrane inclusions repeating the course of the exosporium (Fig.2).

In the clinical isolate *B.cereus* 19, a longitudinal section shows that the spore is located at one pole of the exosporium, a loosely adhering sheath, and most of its internal electron-transparent space is filled with chaotically arranged fragments of membrane structures (Fig.3).

Transverse sections of the spores of clinical isolates show that the exosporium contains structures not present in the spores of the reference strain. In Fig.4 a, b, c, an additional layer of the second exosporium can be seen in clinical isolates 214, 177 and 239.

Thus, the surface spore layers of natural strains and clinical isolates were found to be thicker and, possibly, less permeable than those of the reference strain. Such feature may protect the spore from various bactericidal factors. In the case of natural strains, these may be weather-related influences, whereas clinical isolates must resist the antibacterial defense mechanisms of the host. The reference strain 8035, grown under laboratory conditions, is not exposed to such influences and has a more simplified spore surface.

Electron microscopic examination of the spores of clinical and natural isolates was also carried out using the negative contrast method. Figures 5, 6 show spores and their fragments negatively contrasted with 2% ammonium molybdate. Previously, spores of the reference strain 8035 were examined by negative staining [9].

The exosporium of the examined spore strains, same as in strain 8035, was revealed as an electron-transparent

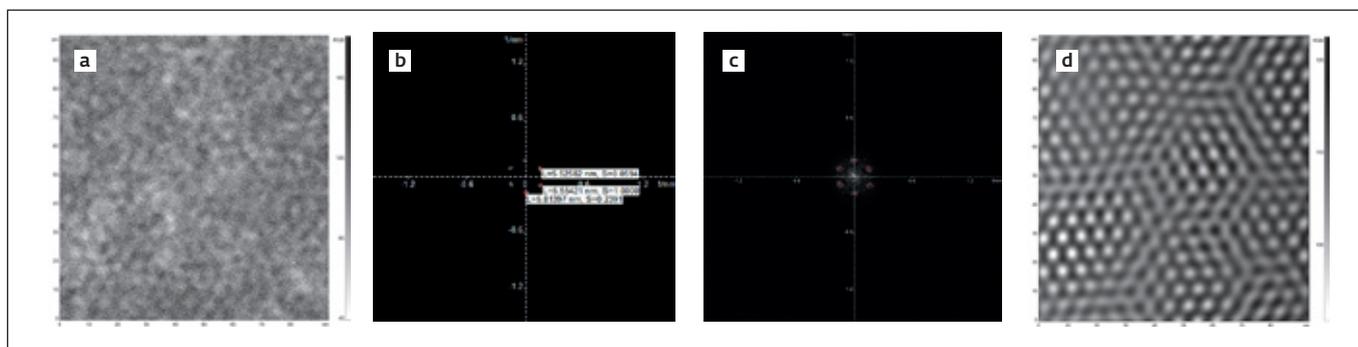


Рис.6. Фурье-преобразование изображения рис.5с в ПО "ФемтоСкан Онлайн": а – исходная область, б – измерение периода рефлексов, с – удаление шумовой составляющей за границей областей, выделенных красной пунктирной линией; д – выделенный фрагмент после фурье-фильтрации

Fig.6. Fourier-transformed image Fig.5c by "FemtoScan Online" software: a – source area, b – measurement of the reflection period, c – removal of the noise component beyond the boundary of areas highlighted by red dotted line; d – highlighted fragment after Fourier-filtering

ВЫВОДЫ

В результате проведенного исследования выявлены общие и различные черты между эталонным штаммом и природными и клиническими изолятами. В частности, выявлены различия в поверхностных слоях спор природных штаммов и клинических изолятов – по сравнению с эталонным штаммом они утолщены и, видимо, лучше защищают споры от проникновения извне. Обнаружен дополнительный слой второго экзоспориума у клинических изолятов. С помощью фурье-фильтрации определены общие особенности в гексагональной упаковке экзоспориума – расстояние между порами одного слоя составляет в среднем 5,5 нм.

Полученные результаты могут быть использованы для понимания особенностей спор *B.cereus* из различных экологических ниш и их чувствительности к спороцидным факторам.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Лондонского Королевского Общества №21-58-10005, РФФИ, проект № 20-32-90036. Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда содействия инновациям, проект №71108, договор 0071108.

ИНФОРМАЦИЯ О РЕЦЕНЗИРОВАНИИ

Редакция благодарит анонимного рецензента (рецензентов) за их вклад в рецензирование этой работы, а также за размещение статей на сайте журнала и передачу их в электронном виде в НЭБ eLIBRARY.RU.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Leggett M.J., McDonnell G., Denyer S.P., Setlow P., Maillard J. Bacterial spore structures and

bilayer sacculus surrounding an electron-dense spore. The peripheral region of the exosporium was examined to reveal the ultrastructure. Figure 5 shows areas of the exosporium in natural strains *B.cereus* 114 and 115 with clearly distinguishable villous and basal layers, and a similar area of the exosporium in clinical isolate 239. Long spore outgrowths are visible on the spore surface of strains 114 and 115.

At high magnification, all images show the hexagonal packing of the subunits of the basal membrane. However, the structure of this membrane is not clearly visible.

To obtain a clear picture of the exosporium spores of the reference strain 8035, Fourier filtering was previously applied and a noise-free image showing hexagonal packing and holes was obtained. Similar work was carried out with exosporium strain 239 (Fig.6). Measurement of the reflex period showed no significant changes in the pore spacing in the hexagonal packing of strain 239 exosporium compared to the reference strain: strain 8035 had a length of 5.6 nm, 6.2 nm and 4.7 nm. In Fig.6c, the length is 5.2 nm, 5.5 nm, 5.8 nm. The average value is the same for the reference strain and strain 239, 5.5 nm.

Figure 7 shows a single-layer fragment of the exosporium of the clinical isolate *B. cereus* 214 showing similarities with the exosporium of the other clinical isolate *B.cereus* 239.

CONCLUSIONS

The study revealed common and different features between the reference strain and the natural and clinical isolates. In particular, differences in the surface layers of the spores of natural strains and clinical isolates were found – as compared to the reference strain, they are thicker and apparently better protect the spores from external penetration. An additional second exosporium



**АНАЛИТИКА
ЭКСПО**

20-я Международная выставка
лабораторного оборудования
и химических реактивов

19-22.04.2022

Москва, МВЦ «Крокус Экспо»



analitikaexpo.com

Забронируйте стенд





- their protective role in biocide resistance. *J. of Applied Microbiol.* 2012, 113, 485-498. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05336.x>
2. Ohye D.F., Murrell W.G. Exosporium and Spore Coat Formation in *Bacillus cereus* T. *J. of Bacteriology.* 1973, 115 (3), 1179-1190. <https://doi.org/10.1128/jb.115.3.1179-1190.1973>
 3. Stewart G.C. The Exosporium Layer of Bacterial Spores: a Connection to the Environment and the Infected Host. *Microbiol Mol Biol Re. v.* 2015. , 79(4), 437-457. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00050-15>
 4. Matz L.L., Beaman T.C., Gerhardt P. Chemical composition of exosporium from spores of *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* 1970, 101, 196-201. <https://doi.org/10.1128/jb.101.1.196-201.1970>
 5. Plieva Z.S., Smirnova T.A., Zubasheva M.V., Smirnov Yu.A., Zhukovitskiy V.G., Akhmetova A.I., Yaminskiy I.V. The structure of the appendages on spores of *Bacillus cereus*. *NANOINDUSTRY.* 2020, 13(7-8), pp. 458-464. <http://dx.doi.org/10.22184/1993-8578.2020.13.7-8.458.464>
 6. Fazzini M.M., Schuch R., Fischetti V.A. A Novel Spore Protein, ExsM, Regulates Formation of the Exosporium in *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis* and Affects Spore Size and Shape. *J. Bacteriol.* 2010, 192(15), 4012-4021. <https://doi.org/10.1128/JB.00197-10>
 7. Ball D.A., Taylor R., Todd S.J. et al. Structure of exosporium and sublayers of spores of the *Bacillus cereus* family revealed by electron crystallography. *Mol. microbiol.* 2008, 68(4) 947-958. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06206.x>
 8. Terry C., Jiang S., Radford D.S. et al. Molecular tilting on the surface of a bacterial spore – the exosporium of the *Bacillus anthracis/cereus/thuringiensis* group. *Mol Microbiol.* 2017, 104(4), pp. 539-552. <https://doi.org/10.1111/mmi.13650>
 9. Plieva Z.S., Smirnova T.A., Zubasheva M.V., Smirnov Yu.A., Zhukhovitskiy V.G., Akhmetova A.I., Yaminsky I.V. Structure of the exosporium of *Bacillus cereus* spores. *NANOINDUSTRY.* 2020, 13(7-8), pp. 426-432. <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2020.13.7-8.426.432>
 10. Ito S., Karnovsky M. Formaldehyde glutaraldehyde fixatives containing trinitrocompound. *J. Cell biol.* 1969, 39, 168a-169a.
 11. Yaminsky I.V., Akhmetova A.I., Meshkov G.B. FemtoScan Online software and visualization of nanoobjects in high resolution microscopy. *Nanoindustry*, 11 (6 (85)) (2018), pp. 414-416.

Декларация о конфликте интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в данной статье.

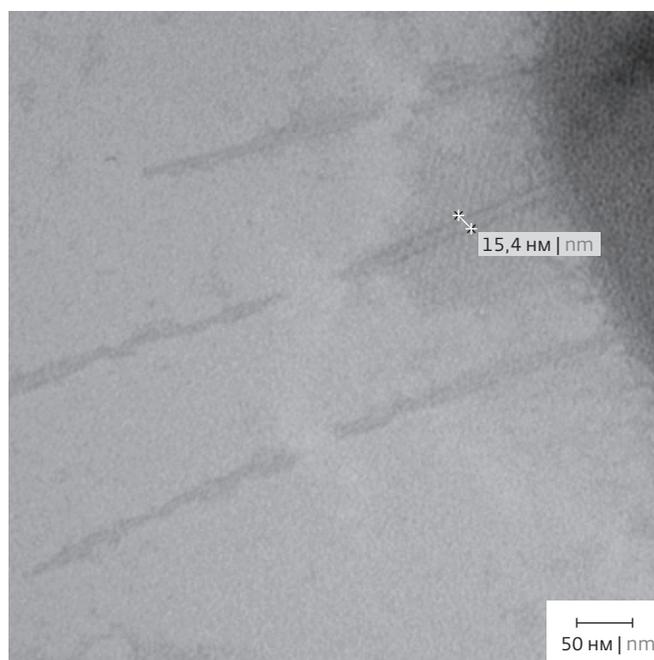


Рис.7. Изображение экзоспориума и однослойного фрагмента экзоспориума штамма 214. Диаметр выроста, связанного с экзоспориумом, 15,4 нм

Fig.7. Image of exosporium and single-layer fragment of exosporium of strain 214. Diameter of the outgrowth associated with the exosporium is 15.4 nm

layer was detected in the clinical isolates. Using Fourier filtration, common features in the hexagonal packing of the exosporium were identified – the distance between the pores of one layer is, on average, 5.5 nm.

The obtained results can be used to understand the characteristics of *B. cereus* spores from different ecological niches and their sensitivity to sporocidal factors.

ACKNOWLEDGMENTS

The study was completed with the financial support of the RFBR and the London Royal Society No. 21-58-10005, and RFBR, Project No. 20-32-90036. This research was carried out with financial support from the Foundation for the Promotion of Innovation, Project No. 71108, and Agreement No. 0071108.

PEER REVIEW INFO

Editorial board thanks the anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work. It is also grateful for their consent to publish papers on the journal's website and SEL eLibrary eLIBRARY.RU.

Declaration of Competing Interest. The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

КЛЮЧЕВОЕ СОБЫТИЕ ОТРАСЛИ:

в центре внимания, в центре Москвы

НАЦИОНАЛЬНЫЙ НЕФТЕГАЗОВЫЙ ФОРУМ

www.oilandgasforum.ru

21-Я МЕЖДУНАРОДНАЯ ВЫСТАВКА НЕФТЕГАЗ-2022



www.neftegaz-expo.ru

18–21 апреля 2022

Москва, ЦВК «ЭКСПОЦЕНТР»



12+

Реклама



МИНПРОМТОРГ
РОССИИ



ЭКСПОЦЕНТР





EI1 – НАНОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ НЕЙРОПРОТЕЗ, КОТОРЫЙ МОЖНО ИНТЕГРИРОВАТЬ С НЕЙРОНАМИ ЧЕЛОВЕКА

Уже более двадцати лет разрабатываются медицинские нейропротезы. Например, кохлеарные имплантаты помогли восстановить функциональный слух у людей с тяжелыми нарушениями слуха. Дальнейшие достижения в области двигательных нейропротезов лежат в области восстановления двигательных функций у людей с тетраплегией – потерей конечностей и параличом ствола мозга.

В настоящее время ученые работают над различными видами интерфейсов "мозг – машина" для восстановления двигательных функций и частичной сенсорной функции. Одним из таких устройств является IpsiHand, позволяющее парализованной руке двигаться. Устройство обнаруживает намерения получателя путем дешифровки электрических сигналов, в результате чего рука человека может осуществлять движения.

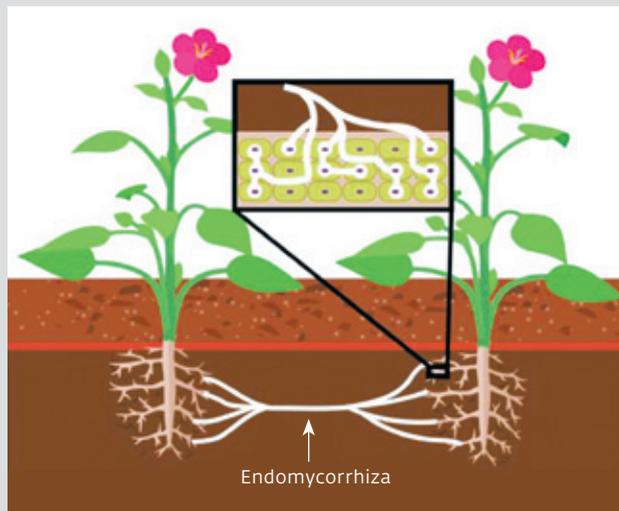
Еще одна недавняя разработка – программа нейрореабилитации походки BMI, в которой используется система визуально-тактильной обратной связи в сочетании с физическим экзоскелетом и управляемыми ЭЭГ искусственными исполнительными механизмами во время ходьбы. Эта программа была опробована на восьми пациентах, которые отметили улучшения в движении нижних конечностей и соматической чувствительности.

Хирургически установленные электродные имплантаты также уменьшили симптомы тремора у людей с болезнью Паркинсона. Несмотря на то, что нейропротезирование дает различные преимущества, у него есть и свои нерешенные проблемы. Во-первых, электродные имплантаты в мозг подвержены деградации, что приводит к необходимости установки новых имплантатов через несколько лет. Во-вторых, как и при любой другой операции, имплантированные электроды могут вызвать послеоперационную инфекцию и образование глиальных рубцов. Кроме того, обнаружилось, что нейробиологическая эффективность имплантата зависит от скорости его введения в организм человека.

Новым шагом явилась идея непосредственного подключения к нейронам. Такой нейропротез мог бы радикально оптимизировать лечение нейродегенеративных заболеваний и травм мозга, а также, возможно, улучшить когнитивные способности.

Международная группа ученых разработала нейропротез на основе нанотехнологий, который был опубликован в журнале *Frontiers in Neuroscience* (Integration of Nanobots Into Neural Circuits As a Future Therapy for Treating Neurodegenerative Disorders).

Интересной особенностью нейропротеза с наноботами является то, что он был заимствован из природы посредством эндомикоризы – симбиоза растения и гриба, которому более четырехсот миллионов лет. В процессе эндомикориза грибы используют многочисленные нитевидные выступы, называемые мицелием, которые проникают в корни растений, образуя колоссальные подземные сети с близлежащими корневыми системами. Во время этого процесса грибы забирают жизненно важные питательные вещества, одновременно защищая корни растений от инфекций. Поэтому нанонейропротез получил название "интерфейс лиганда эндомикоризы", или сокращенно "EI1".



Концепция эндомикоризы и механизм ее проникновения в клетки корней растений, а также схема соединения двух разных растений. Благодаря этому между растениями передаются биологические свойства, например иммунный ответ одного растения другому

Конструкция EI1 состоит из камеры, содержащей положительно заряженные ионы и множество нитей, отходящих от камеры с катионами. Нити наноробота образуют сетку и простираются до нейронов.

Предполагается, что каждый кончик нити сможет проникать в определенные участки нейрона, такие как тело клетки, аксон и дендриты, обеспечивая тем самым связь с ними. Это может стать возможным благодаря использованию биохимических свойств мембран нейронов.

Теоретически, после установления связи, EI1 сможет передавать потенциалы действия между соединяющимися нейронами и передавать их обратно. Более того, EI1 также сможет повысить скорость передачи потенциалов действия.

Крайне важно, что в экологических системах, которые могут самовосстанавливаться и самокорректироваться, EI1 сможет обходить поврежденные пресинаптические нейроны и передавать потенциалы действия близлежащим нейронам.

Таким образом, EI1 будет функционировать для восстановления нарушенных нейронных путей, наблюдаемых при нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и других заболеваниях мозга. EI1 будет сконструирован таким образом, чтобы использовать окружающую электрохимическую мозговую среду в качестве источника энергии.

По материалам: <https://www.nanowerk.com>



НАНОМАТЕРИАЛЫ ПОМОГАЮТ В ЛЕЧЕНИИ РАКА

Наноматериалы произвели революцию в мире лечения рака, а наночастицы растительного происхождения имеют дополнительное преимущество – они экономически эффективны и просты в массовом производстве. Исследователи из Токийского научного университета недавно разработали новые бионаночастицы, полученные из кукурузы, для прямого воздействия на раковые клетки через иммунный механизм. Полученные результаты обнадеживают, технология продемонстрировала эффективность при лечении больных мышей. Более того, до сих пор у мышей не было зарегистрировано никаких серьезных побочных эффектов.

Наночастицы продемонстрировали огромный потенциал во многих областях науки и техники, включая терапию. Однако обычные, синтетические наночастицы сложны и дороги в производстве. Внеклеточные везикулы (EVs), которые появились в качестве альтернативы синтетическим наночастицам, демонстрируют трудности в массовом производстве.

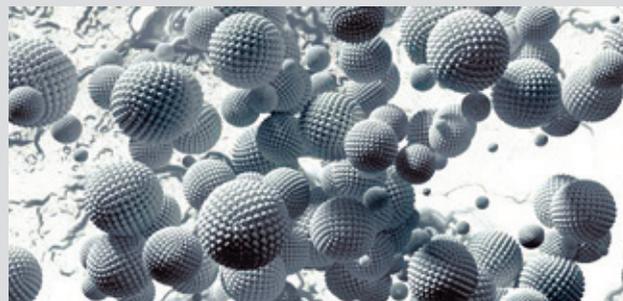
Другим недавно появившимся вариантом являются наночастицы (НП) растительного происхождения, которые можно легко производить в больших количествах при относительно низких затратах. Как и EVs, системы на основе таких наночастиц также содержат биоактивные молекулы, включая полифенолы (известные антиоксиданты) и микроРНК, которые могут доставлять лекарства в целевые органы нашего тела.

Используя эти знания, исследователи из Токийского научного университета (TUS) недавно разработали бионаночастицы с противораковой активностью, используя в качестве сырья кукурузу (маис).

Профессор Макия Нишикава из Токийского научного университета (Япония), возглавлявший исследовательскую группу в этом начинании, поясняет: "Контролируя физико-химические свойства наночастиц, мы можем управлять их фармакокинетикой в организме; поэтому мы хотели изучить наночастицы съедобных растений. Маис, или кукуруза, производится в больших количествах по всему миру как в своем родном виде, так и в генетически модифицированных формах. Именно поэтому мы выбрали ее для нашего исследования". Результаты исследования были опубликованы онлайн 24 ноября 2021 года в журнале *Scientific Reports*.

Команда создала однородную смесь суперсладкой кукурузы в воде, затем центрифугировала этот кукурузный сок на высокой скорости, после чего отфильтровала его через шприцевой фильтр с размером пор 0,45 мкм. Затем отфильтрованные образцы подвергались ультрацентрифугированию для получения NPs, полученных из кукурузы. Полученные из кукурузы NPs (сNPs) имели диаметр около 80 нм. Довольно интересно, что эти НПФ также несли крошечный чистый отрицательный заряд -17 мВ.

Затем исследовательская группа поставила эксперименты, чтобы выяснить, поглощаются ли эти УНП различными типами клеток. В серии многообещающих результатов было показано, что кНП были поглощены несколькими типами клеток, включая клинически значимые опухолевые клетки colon26 (раковые клетки, полученные от мышей),



макрофагоподобные клетки RAW264.7 и нормальные клетки NIH3T3. Клетки RAW264.7 обычно используются в качестве скрининга *in vitro* для иммуномодуляторов – лекарств, которые в первую очередь направлены на различные пути развития рака.

Результаты были поразительными: из трех типов клеток, сNPs значительно подавляли рост только клеток colon26, что указывает на их избирательность в отношении канцерогенных клеточных линий. Более того, сNPs смогли успешно индуцировать высвобождение фактора некроза опухоли- α (TNF- α) из клеток RAW264.7. Хорошо задокументированный факт состоит в том, что TNF- α в основном выделяется макрофагами, естественными клетками-киллерами и лимфоцитами – тремя ключевыми компонентами нашей высокоразвитой иммунной системы, которые помогают вызвать противораковый ответ. "Сильный ответ TNF α был обнадеживающим и указывал на роль сNP в лечении различных видов рака", – объясняет доктор Дайсукэ Сасаки, первый автор исследования, преподаватель и научный сотрудник TUS.

Затем исследовательская группа провела репортерный анализ с использованием фермента "люцифераза" (полученного из светлячков), который является чувствительным репортером для изучения различных биологических реакций. Этот анализ на основе люциферазы показал, что мощная комбинация сNPs и клеток RAW264.7 значительно подавляла пролиферацию клеток colon26. Наконец, исследовательская группа изучила действие сNPs на лабораторных мышах, у которых были подкожные опухоли. И снова результаты оказались поразительными: ежедневное введение наночастиц в опухоли colon26 значительно подавляло рост опухоли, не вызывая серьезных побочных эффектов или потери веса.

"Оптимизируя свойства наночастиц и комбинируя их с противораковыми препаратами, мы надеемся разработать безопасные и эффективные лекарства от различных видов рака", – оптимистично замечает профессор Нишикава.

Доктор Косукэ Кусамори, соавтор работы и доцент TUS, резюмируя полученные результаты, говорит: "Эти сNPs обладают превосходными противоопухолевыми свойствами, их легко разрабатывать, и они экономически выгодны. Более того, они не проявляют никаких серьезных побочных эффектов, по крайней мере, у мышей".

По материалам: <https://researchfeatures.com>