



Получено: 11.08.2022 г. | Принято: 17.08.2022 г. | DOI: <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2022.15.5.254.261>

Научная статья

## КРИСТАЛЛООБРАЗОВАНИЕ В БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ *BREVIBACILLUS LATEROSPORUS*

М.В.Зубашева<sup>1</sup>, к.б.н., науч. сотр., ORCID: 0000-0001-7330-7343

А.И.Ахметова<sup>2, 3</sup>, инженер НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ, ведущий специалист Центра перспективных технологий, ORCID: 0000-0002-5115-8030

Т.А.Смирнова<sup>1</sup>, д.б.н., вед. науч. сотр., ORCID: 0000-0001-7121-635X

Н.В.Шевлягина<sup>1</sup>, к.м.н., ст. науч. сотр., ORCID: 0000-0001-9651-1654

Ю.А.Смирнов<sup>1</sup>, д.м.н., проф., вед. науч. сотр., ORCID: 0000-0002-2215-5420

В.Г.Жуховицкий<sup>1, 4</sup>, к.м.н., руководитель лаб., ORCID: 0000-0002-4653-2446

И.В.Яминский<sup>2, 3</sup>, д.ф.-м.н., проф. физического и химического факультетов МГУ имени М.В.Ломоносова, директор Центра перспективных технологий, ORCID: 0000-0001-8731-3947 / [yaminsky@nanoscopy.ru](mailto:yaminsky@nanoscopy.ru)

**Аннотация.** Бациллы *Brevibacillus laterosporus* (Bl) являются перспективным источником бактериальных инсектицидов. Способность к кристаллообразованию у бактерий Bl до недавнего времени не была установлена. Методами сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии охарактеризованы бактериальные клетки *Brevibacillus laterosporus*. Изучено образование в бактериях белковых кристаллов от первых этапов зарождения в клетках и до стадии появления свободных кристаллов. Получены изображения кристаллов с молекулярным разрешением и определены параметры кристаллической решетки. В случае энтомоцидных бацилл в клетках образуются кристаллические белковые токсины, которые приводят к гибели насекомых после поглощения ими бактерий. Таков механизм защиты этих бактериальных клеток. В этом случае кристаллы выполняют защитную функцию живых организмов.

**Ключевые слова:** *Brevibacillus laterosporus*, просвечивающая электронная микроскопия, образование кристаллов, споры, токсины, защитная функция

**Для цитирования:** М.В. Зубашева, А.И. Ахметова, Т.А. Смирнова, Н.В. Шевлягина, Ю.А. Смирнов, В.Г. Жуховицкий, И.В. Яминский. Кристаллообразование в бактериальных клетках *Brevibacillus laterosporus*. НАНОИНДУСТРИЯ. 2022. Т. 15, № 5. С.254–261. <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2022.15.5.254.261>

Received: 11.08.2022 | Accepted: 17.08.2022 | DOI: <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2022.15.5.254.261>

Original paper

## CRYSTAL FORMATION IN BACTERIAL CELLS OF *BREVIBACILLUS LATEROSPORUS*

M.V.Zubasheva<sup>1</sup>, Cand. of Sci. (Biology), Researcher, ORCID: 0000-0001-7330-7343

A.I.Akhmetova<sup>2, 3</sup>, Engineer of A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Leading Specialist of Advanced Technologies Center, ORCID: 0000-0002-5115-8030

<sup>1</sup> 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

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

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

<sup>4</sup> ФГБОУ ДПО "Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования (РМАНПО)" Минздрава РФ, Москва, Россия / Russian Medical Academy of Continuing Professional Education (RMAPE), Moscow, Russia



T.A.Smirnova<sup>1</sup>, Doct. of Sci. (Biology), Leading Researcher, ORCID: 0000-0001-7121-635X

N.V.Shevlyagina<sup>1</sup>, Cand. of Sci. (Medical), Senior Researcher, ORCID: 0000-0001-9651-1654

Yu.A.Smirnov<sup>1</sup>, Doct. of Sci. (Medical), Prof., Leading Researcher, ORCID: 0000-0002-2215-5420

V.G.Zhukhovitsky<sup>1, 4</sup>, Cand. of Sci. (Medical), Head of Laboratory ORCID: 0000-0002-4653-2446

I.V.Yaminsky<sup>2, 3</sup>, Doct. of Sci. (Physics and Mathematics), Prof. of Lomonosov Moscow State University, Physical and Chemical departments, Director of Advanced Technologies Center, ORCID: 0000-0001-8731-3947 / [yaminsky@nanoscopus.ru](mailto:yaminsky@nanoscopus.ru)

**Abstract.** *Bacillus Brevibacillus laterosporus* (Bl) is a promising source of bacterial insecticides. The crystal-forming ability of Bl bacteria has not been established until recently. Bacterial cells of *Brevibacillus laterosporus* were characterized with the aid of scanning and transmission electron microscopy. The formation of protein crystals in bacteria from the first stages of nucleation in the cells up to the stage of free crystals was studied. Molecular resolution images of the crystals have been obtained and the crystal lattice parameters have been determined. In the case of entomocidal bacilli, crystalline protein toxins are formed in the cells, which lead to death of insects after absorption by the bacteria. This is the defense mechanism of these bacterial cells. In such case, the crystals perform the protective function of living organisms.

**Keywords:** *Brevibacillus laterosporus*, transmission electron microscopy, crystal formation, spores, toxins, protective function

**For citation:** M.V. Zubasheva, A.I. Akhmetova, T.A. Smirnova, N.V. Shevlyagina, Yu.A. Smirnov, V.G. Zhukhovitsky, I.V. Yaminsky. Crystal formation in bacterial cells of *Brevibacillus laterosporus*. NANOINDUSTRY. 2022. V. 15, no. 5. PP.254-261. <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2022.15.5.254.261>

## ВВЕДЕНИЕ

Образование кристаллов или кристаллических включений является редким явлением в живой природе. В основном кристаллы образуются в неживой природе. Они представляют собой кристаллические породы, драгоценные камни и др. Углерод имеет несколько кристаллических форм – алмаз, графит, а также мелкокристаллический порошок карбин. Образование кристаллов происходит при суммарном уменьшении энергии строительных единиц – атомов или молекул – в кристалле по сравнению с их энергией в растворе. Может происходить и обратный процесс, растворение кристаллов, если в растворе наблюдается явный недостаток растворенного вещества. Кристаллы присутствуют в живой природе, например, в магнитотактических бактериях синтезируются магнитные кристаллы оксида или сульфида железа. Размеры кристаллов находятся в диапазоне 25–130 нм [1, 2]. Эти кристаллы обеспечивают защитные функции у бактерий за счет присутствия токсичного двухвалентного иона. Среда обитания этих бактерий содержит избыток железа. Эти бактерии перемещаются вдоль силовых линий магнитного поля. Магнитные кристаллы действуют, как магнитная стрелка.

Наиболее хорошо изучены кристаллы *Bacillus thuringiensis* (Bt) в связи с их энтомоцидной активностью против чешуекрылых (*Lepidoptera*), двукрылых (*Diptera*), жесткокрылых (*Coleoptera*) насекомых. Изучение энтомоцидных кристаллов Bt

## INTRODUCTION

The formation of crystals or crystalline inclusions is a rare phenomenon in living nature. Mostly crystals are formed in non-living nature. They are represented by crystalline rocks, gemstones, etc. Carbon has several crystalline forms - diamond, graphite and also the fine crystalline powder carbine. Formation of crystals occurs when the total energy of the building units - atoms or molecules - in the crystal is reduced in comparison to their energy in solution. The reverse process, dissolution of crystals, can also occur if there is a clear lack of dissolved matter in the solution. Crystals are present in living organisms, for example, magnetic crystals of iron oxide or iron sulfide are synthesised in magnetotactic bacteria. The size of the crystals ranges within 25–130 nm [1, 2]. These crystals provide protective functions in bacteria due to presence of a toxic divalent ion. The habitat of these bacteria contains excess iron. These bacteria move along magnetic field lines. Magnetic crystals act like a magnetic arrow.

*Bacillus thuringiensis* (Bt) crystals are the best studied due to their entomocidal activity against *Lepidoptera*, *Diptera* and *Coleoptera* insects. A study of entomocidal Bt crystals revealed several basic morphological types: bipyramidal, spherical-amorphous, flat square, cubic, stick-shaped. Most of the crystals active against *Lepidoptera* were bipyramidal or cubic in shape. Irregular, spherical and rod-shaped crystals could be mosquito-cidal. Flat, square crystals were active against *Coleoptera* [3]. Bt spores and crystals are

обнаружило несколько их основных морфологических типов: бипирамидальный, сферическо-аморфный, плоский квадратный, кубический, палочковидный. Большинство кристаллов, активных против лепидоптера, имели бипирамидальную или кубическую форму. Иррегулярные, сферические и палочковидные кристаллы могли быть москитоцидными. Плоские, квадратные кристаллы активны против *Coleoptera* [3]. Споры и кристаллы *Bt* применяются для борьбы с насекомыми-вредителями. Однако препараты на их основе не полностью отвечают необходимым требованиям. В настоящее время проводится поиск и изучение других экологически безопасных бактериальных препаратов.

Бациллы *Brevibacillus laterosporus* (*Bl*), в отличие от *Bt*, относятся к малоизученным энтомопатогенным бактериям. Их отличительная особенность – наличие каноевидного включения, прикрепленного к споре. Ранее нами были изучены и охарактеризованы штаммы *Bl*, способные образовывать параспоральные кристаллы [4]. У исследованных штаммов *Bl* удалось обнаружить кристаллические включения, различающиеся по форме и размерам, подобные тем, что описаны для энтомопатогенных бактерий *Bt*. Наибольшая активность у *Bl* выявлена против насекомых отряда двукрылых (*Diptera*). К этому отряду относятся комары родов *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* и черные мушки (*Simulium vittatum*). Многие виды комаров являются переносчиками возбудителей малярии, желтой лихорадки, лихорадки денге, геморрагической лихорадки и лимфатического филяриоза. Синтетические инсектициды оказывают неблагоприятное воздействие на человека и природу. Кроме того, обнаружена устойчивость к таким инсектицидам у комаров, являющихся переносчиками патогенов.

Альтернативой для решения этих проблем и ограничений является биологический контроль с помощью энтомопатогенных бактерий. *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* (*Bti*) оказался первым подвидом *Bt*, токсичным для двукрылых [5]. Исследование природы инсектицидных факторов показало, что насекомые отряда двукрылых (*Diptera*) комары и черные мушки чувствительны к параспоральному включению *Bti*, которое состоит из четырех белков *Cry4Aa*, *Cry4Ba*, *Cry11Aa*, *Cyt1Aa* [6]. Ben-Dov [7] сообщил, что ларвицидная активность заключается в четырех основных (134, 128, 72 и 27 кДа) и, по крайней мере, двух второстепенных (78 и 29 кДа) полипептидах, кодируемых генами *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry11Aa*, *cyt1Aa*, *cry10Aa* и *cyt2Ba*, картированных на плазмиде размером 128 т.п.н., известной как *pBtoxis*. Эти  $\delta$ -эндотоксины образуют сложное параспоральное кристаллическое тело с чрезвычайно высокой

used to control insect pests. However, preparations based on them do not fully meet the necessary requirements. Other environmentally friendly bacterial preparations are currently being sought and studied.

*Bacilla Brevibacillus laterosporus* (*Bl*), in contrast to *Bt*, are poorly studied entomopathogenic bacteria. Their distinctive feature is the presence of a canoeid inclusion attached to the spore. We have previously studied and characterized strains of *Bl* capable of forming paraspore crystals [4]. The studied *Bl* strains exhibited crystalline inclusions of different shapes and sizes, similar to those described for the entomopathogenic *Bt* bacteria. The highest activity of *Bl* was detected against insects of the *Diptera* order. This includes mosquitoes of the genera *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* and black flies (*Simulium vittatum*). Many mosquito species are vectors of malaria, yellow fever, dengue fever, haemorrhagic fever and lymphatic filariasis. Synthetic insecticides have adverse effects on humans and nature. In addition, resistance to such insecticides has been found in pathogen-transmitting mosquitoes.

An alternative to address these problems and limitations is biological control using entomopathogenic bacteria. *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* (*Bti*) was the first subspecies of *Bt* to be toxic to twoflies [5]. A study on the nature of the insecticidal factors showed that insects of the *Diptera* order, mosquitoes and black flies, are sensitive to the paraspore inclusion of *Bti*, which consists of four proteins *Cry4Aa*, *Cry4Ba*, *Cry11Aa*, *Cyt1Aa* [6]. Ben-Dov [7] reported that the larvicidal activity consists of four major (134, 128, 72 and 27 kDa) and at least two minor (78 and 29 kDa) polypeptides encoded by the *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry11Aa*, *cyt1Aa*, *cry10Aa* and *cyt2Ba* genes mapped to a 128000 bp plasmid known as *pBtoxis*. These  $\delta$ -endotoxins form a complex paraspore crystalline body with extremely high specificity. Electron microscopy has shown that *Bti* cells form inclusions that consist of different segments, an osmiophilic or lightly stained, crystallized lattice segment with a period of 4.3 nm and an osmophilic, stained lattice segment with a period of 7.8 nm. The complex of several crystals is enclosed in a common shell [8].

The crystalline inclusions of *Bl* can have a cubic shape. We wrote about cubic shape of crystals earlier [9]. In the present paper we show the results of study of rhombic crystals in *Bl* cells. This work is devoted to a study of the process of crystal formation in *Bl* during sporulation and to the analysis of the structure of crystals.

## METHODS AND MATERIALS

In this work we made and used the following:

Strain *B. laterosporus* (*Bl*) 16–92 was isolated from a dead insect.

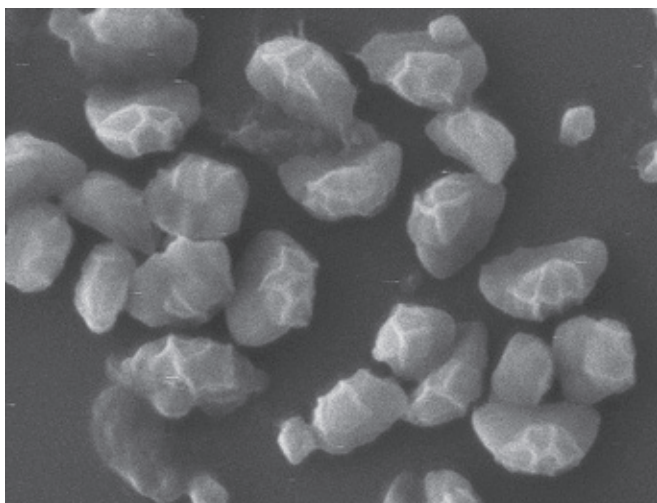


Рис.1. Зрелые споры с каноевидным включением и кристаллы штамма BI 16-92, СЭМ

Fig.1. Mature spores with canoeid inclusion and crystals of strain BI 16-92, SEM

специфичностью. Электронная микроскопия показала, что клетки *Bti* образуют включения, которые состоят из различных сегментов, осмиофобного или слегка окрашенного, кристаллизованного в виде решетки с периодом 4,3 нм и осмиофильного окрашенного сегмента с кристаллической решеткой с периодом 7,8 нм. Комплекс из нескольких кристаллов заключен в общую оболочку [8].

Кристаллические включения *BI* могут иметь кубическую форму. О кубической форме кристаллов мы писали ранее [9]. В настоящей статье мы приводим результаты изучения ромбических кристаллов в клетках *BI*. Данная работа посвящена изучению процесса кристаллообразования у *BI* при споруляции, а также анализу структуры кристаллов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штамм *B. laterosporus* (*BI*) 16-92 был выделен из погибшего насекомого.

Штамм выращивали на агаризованной среде NBY в течение 48-96 ч при 30 °С.

Электронная микроскопия.

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ).

Нативную споро-кристаллическую суспензию исследовали с помощью электронно-ионного сканирующего микроскопа Quanta 2003D (FEI Company, USA). Образцы нативной суспензии помещали на кремниевую подложку, которую с помощью углеродного скотча фиксировали к алюминиевому столику. Препараты исследовали в режиме высокого и низкого вакуума. Поверхность образца сканировали при ускоряющем напряжении 5-30 кВ.

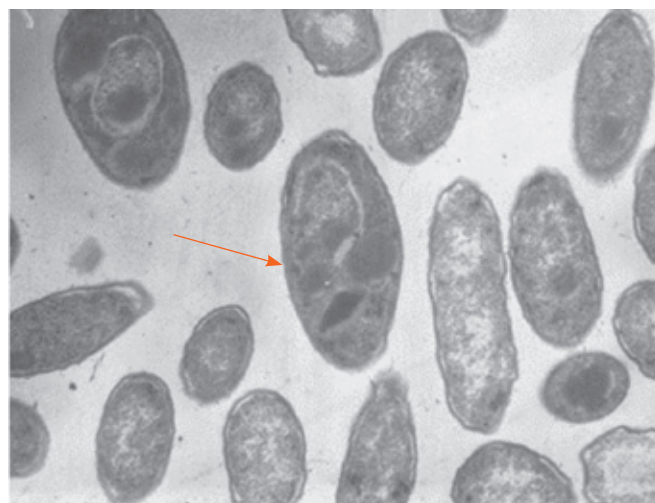


Рис.2. Срезы штамма BI 16-92. Стрелкой показана проспора, на некотором расстоянии от которой находится ромбовидный кристалл, ПЭМ

Fig.2. Sections of strain BI 16-92. The arrow shows the prospora, at some distance from which the lozenge-like crystal is located, TEM

The strain was grown on NBY agarized medium for 48-96 h at 30 °C.

Electron microscopy.

Scanning electron microscopy (SEM).

The native spore-crystalline suspension was examined using a Quanta 2003D electron ion scanning microscope (FEI Company, USA). Samples of the native suspension were placed on a silicon substrate, which was fixed to an aluminum table using carbon tape. The preparations were examined in high and low vacuum. The surface of the sample was scanned at an accelerating voltage of 5-30 kV.

## Transmission electron microscopy (TEM)

Bacilli of strain 16-92 were washed off the agar and fixed first by the Ito-Karnowsky method [10]. The material was then fixed in 1% OsO<sub>4</sub> solution on 0.2 M cacodylate buffer and in 1% uranyl acetate solution on 0.2 M maleate buffer. The material was dehydrated in alcohol concentrations of 50°, 70°, 96°, 100°. The material was then placed in a mixture of 100° alcohol and LR White resin and then in pure LR White resin. The material was transferred into gelatin capsules, which were placed in a thermostat at 56 °C. Sections were obtained on an LKB III ultra-tome (LKB, Sweden) and contrasted with a 1% solution of uranyl acetate in 70° alcohol and citric acid lead. Spore and crystal suspensions for negative contrast studies were applied to carbon-film-coated grids and stained with 2% aqueous NANOWtm. The preparations were examined on electron microscopes JEM -100 B and LEO912AB.

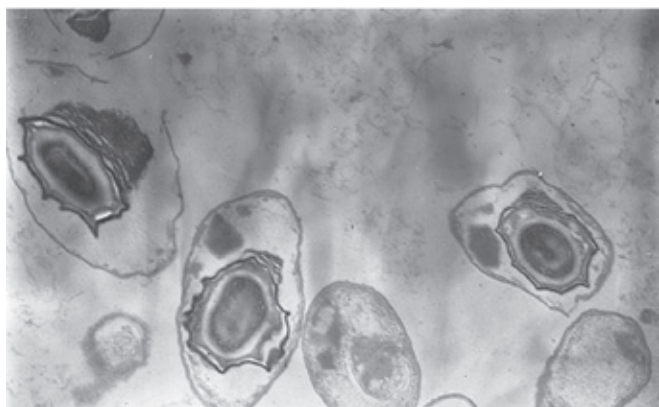


Рис.3. Bl 16-92. Лизис цитоплазмы спорангия, клеточная оболочка по большей части сохранена, но присутствуют и разрушенные экземпляры, ПЭМ

Fig.3. Bl 16-92. Lysis of sporangium cytoplasm and cell membrane are mostly preserved, but destroyed specimens are also present, TEM

### Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ)

Бациллы штамма 16-92 смывали с агара и фиксировали сначала по методу Ито-Карновски [10]. Затем материал фиксировали в 1%  $\text{OsO}_4$  растворе на 0,2 М какодилатном буфере и в 1% растворе уранилацетата на 0,2 М малеатном буфере. Материал обезживали 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. Суспензию спор и кристаллов для исследования методом негативного контрастирования наносили на сетки, покрытые углеродной пленкой, и окрашивали 2% водным раствором NANOW™. Препараты исследовали на электронных микроскопах JEM -100 В и LEO912AB.

Обработка изображений проведена в программном обеспечении "ФемтоСкан Онлайн" [11]. Для определения параметров кристаллической решетки наблюдаемых кристаллов использовано двумерное Фурье-преобразование.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

Было изучено кристаллообразование у Bl: от первых этапов и до стадии появления свободных кристаллов. Для обнаружения кристаллов споро-кристаллическую суспензию штамма 16-92 исследовали с помощью СЭМ. На рис.1 видны зрелые споры с каноевидным включением и ромбические кристаллы. Кристаллы были связаны со спорами либо находились в свободном состоянии.

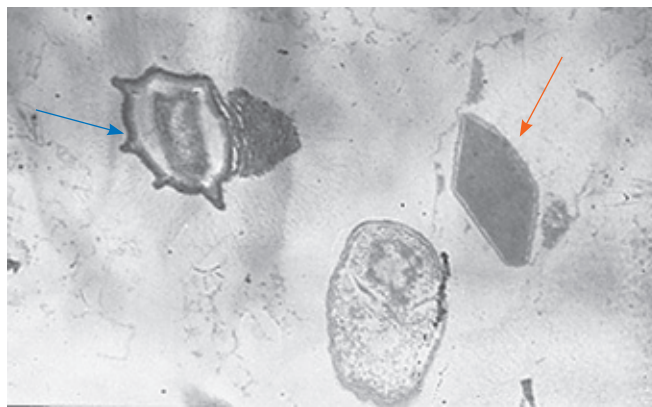


Рис.4. Спора с каноевидным включением (показана голубой стрелкой) и кристалл после выхода из спорангия (показан оранжевой стрелкой), ПЭМ

Fig.4. Spore with canoeid inclusion (shown by the blue arrow) and crystal after leaving the sporangium (shown by the orange arrow), TEM

The images were processed using FemtoScan Online software [11]. A two-dimensional Fourier transform was used to determine the lattice parameters of the observed crystals.

### RESULTS

Crystal formation in Bl was studied: from the first stages up to the stage of free crystals. To detect crystals, a spore-crystalline suspension of strain 16-92 was examined using SEM. Figure 1 shows mature spores with a canoe-shaped inclusion and rhombic crystals. The crystals were either bound to the spores or were in a free state.

Electron microscopic examination of ultrathin sections of strain Bl 16-92 by TEM showed that the growing, dividing cells did not contain crystals. Crystals appeared in vegetative cells before entering the sporulation stage. Thereafter, the crystal-forming cells went through all the stages of spore formation. In Fig.2 a prospore can be seen, at some distance from which a rhomboidal crystal is located. In Bl crystals are formed without connection to the spore structures. Near the crystal there is a rarefaction of the cytoplasm.

Lysis of the sporangium cytoplasm around the spore and the crystal increases as the spore matures. In addition to the crystalline inclusion, an overgrowth of a lamellar canoeid inclusion is observed. Fig.3 shows that the cytoplasm of the sporangium is completely lysed and the cell membrane is preserved in most spores, but partially destroyed in some. Figure 4 shows the spore with canoeid inclusion and a crystal after leaving the sporangium. As in Bt, spores and crystals of Bl are released separately during sporangium lysis.

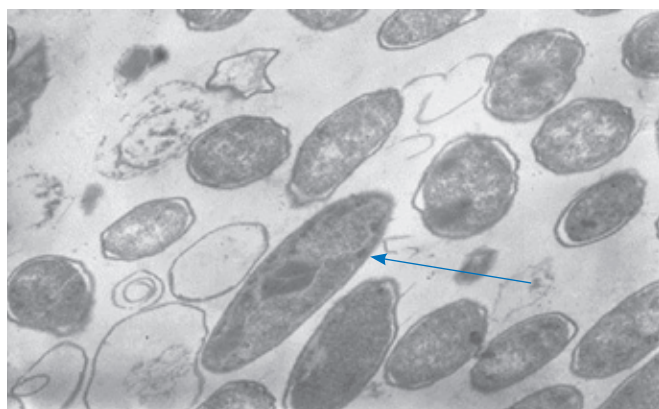


Рис.5. *Bt* 16-92. Стрелкой показана бактерия с образованием двух кристаллов, ПЭМ

Fig.5. *Bt* 16-92. The arrow shows the bacterium with the formation of 2 crystals, TEM

Электронно-микроскопическое изучение ультратонких срезов штамма *Bt* 16-92 методом ПЭМ показало, что растущие, делящиеся клетки не содержали кристаллов. Кристаллы появлялись в вегетативных клетках до вхождения в стадию споруляции. В дальнейшем кристаллообразующие клетки проходили все этапы спорообразования. На рис.2 видна проспора, на некотором расстоянии от которой находится ромбовидный кристалл. У *Bt* кристаллы формируются без связи со споровыми структурами. Около кристалла наблюдается разряженность цитоплазмы.

Лизис цитоплазмы спорангия вокруг споры и кристалла нарастает по мере созревания споры. Наряду с кристаллическим включением наблюдается разрастание пластинчатого каноевидного включения. На рис.3 видно, что цитоплазма спорангия полностью лизирована, а клеточная оболочка у большей части спор сохранена, но у некоторых частично разрушена. На рис.4 видны спора с каноевидным включением и кристалл после выхода из спорангия. Как и у *Bt*, при лизисе спорангия споры и кристаллы *Bt* освобождаются раздельно.

В некоторых клетках *Bt* образуется по два и более кристаллов. Это видно на рис.5: различим кристалл сложного строения.

Кристаллы заключены в общую оболочку (рис.5, 6, 7, 8).

Кристаллы имеют одинаковую электронную плотность, что отличает их от комплекса кристаллов *Bti*. У *Bti* имеется несколько кристаллов в общей оболочке, различающихся по электронной плотности.

Сложное строение кристаллов *Bt* подтверждено дальнейшими исследованиями.



Рис.6. *Bt* 16-92. Стрелкой показан кристалл, ПЭМ

Fig.6. *Bt* 16-92. The arrow shows the crystal, TEM

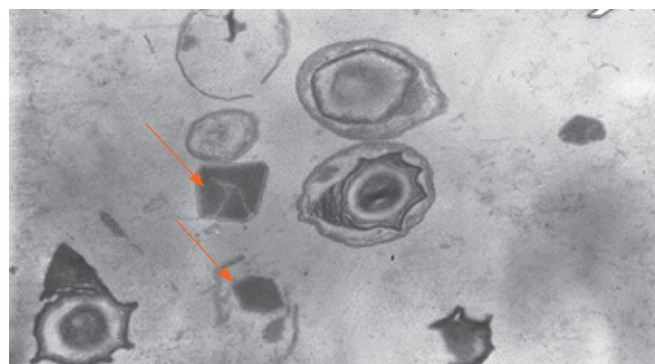


Рис.7. *Bt* 16-92. Стрелками показаны кристаллы, ПЭМ

Fig.7. *Bt* 16-92. The arrows show the crystals, TEM

Two or more crystals form in some *Bt* cells. This can be seen in Fig.5: a crystal of complex structure is distinguishable.

The crystals are enclosed in a common shell (Fig.5, 6, 7, 8).

The crystals have the same electron density, which distinguishes them from the *Bti* crystal complex. *Bti* has several crystals in a common shell with different electron densities.

Область кристаллических включений, видимая при негативном контрастировании, имеет ромбовидную форму, как представлено на рис.9.

Следует заметить, что наблюдаемая область ромбовидной формы размером  $320 \times 540$  нм (рис.9) является не единичным кристаллом, а скорее представляет собой скопление отдельных кристаллов меньшего размера. При этом размеры отдельных кристаллов находятся в диапазоне от 25 до 120 нм. Если рассматривать поверхность одиночного кристалла, то по Фурье-образу заметна скорее гексагональная упаковка белков в кристалле (рис.10). Соответственно, на Фурье-образе наблюдается шесть рефлексов. Рефлексы расположены не на окружности, а на эллипсе. Причинами могут являться два обстоятельства:

1. белковые молекулы, составляющие кристалл, имеют вытянутую форму;
2. это аппаратный эффект (артефакт).

Наличие нескольких возможных упаковок белковых кристаллов наблюдается, например, в случае лизоцима. При разных условиях кристаллизации получается тетрагональная или орторомбическая упаковка [12].

В случае кристаллов *B1* наличия двух упаковок показывает, что должен более или менее существенно различаться биохимический состав внутреннего компартмента клетки, где происходит кристаллизация. Это наблюдение показывает, что включение *B1* сходно с похожим включением *Bti*.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Лондонского Королевского Общества № 21-58-10005, РФФИ, проект № 20-32-90036, РФФИ, проект № 20-12-00389. Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда содействия инновациям, проект № 71108.

### 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.

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

### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Bazyliński D.A., Heywood B.R., Mann S., Franke R.B.  $Fe_3O_4$  and  $Fe_3S_4$  in a bacterium. *Natura*. 1993. 366, 6452, pp. 218-218.

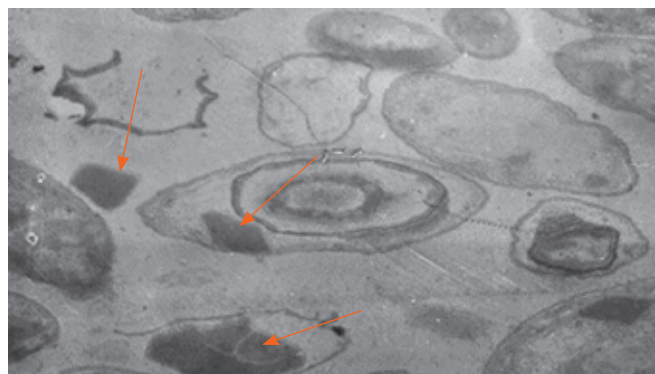


Рис.8. *B1* 16-92. Стрелками показаны кристаллы, ПЭМ  
Fig.8. *B1* 16-92. The arrows show the crystals, TEM

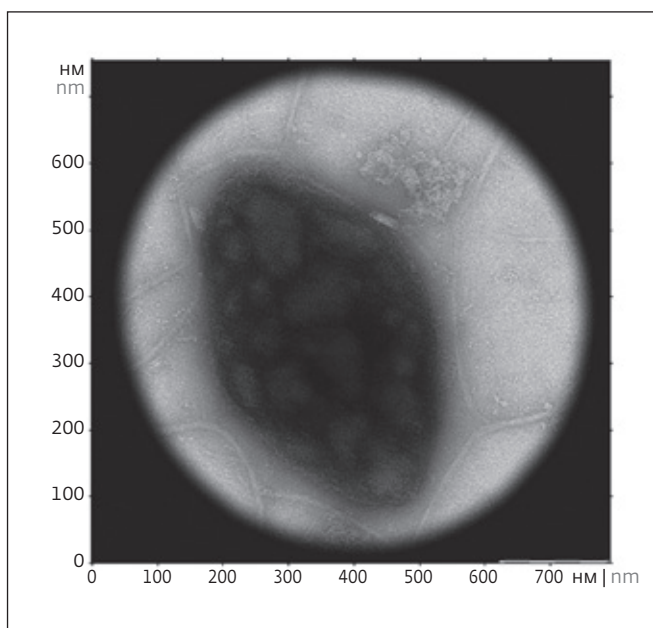


Рис.9. Область кристаллических включений ромбовидной формы, ПЭМ  
Fig.9. Area of diamond-shaped crystalline inclusions, TEM

The complex structure of *B1* crystals was confirmed by further studies.

The area of crystalline inclusions visible in negative contrast has a diamond shape, as shown in Fig.9.

It should be noted that the observed diamond-shaped region of  $320 \times 540$  nm (Fig.9) is not a single crystal but rather a cluster of individual smaller crystals. The size of single crystals ranges from 25 to 120 nm. If we consider the surface of a single crystal, the Fourier image rather shows hexagonal packing of proteins in the crystal (Fig.10). Accordingly, 6 reflexes are observed in the Fourier image. The reflexes are not located on a circle, but on an ellipse. There could be two reasons for this:



2. Bazylnski D.A., Frankel R.B., Heywood B.R., Mann S., King J.W., Donaghay P.L., Hanson A.K. Controlled Biomineralization of Magnetite ( $\text{Fe}(\text{inf}3)\text{O}(\text{inf}4)$ ) and Greigite ( $\text{Fe}(\text{inf}3)\text{S}(\text{inf}4)$ ) in a Magnetotactic Bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*. 1995. Vol. 61, 9, pp. 3232–3239. <https://doi.org/10.1128/aem.61.9.3232-3239.1995>
3. Benintende G., López-Meza J., Cozzi J., Piccinetti C., Ibarra J. Characterization of INTA 51-3, a New Atypical Strain of *Bacillus thuringiensis* from Argentina. *Current Microbiology*. 2000. Vol. 41, pp. 396–401. <https://doi.org/10.1007/s002840010157>
4. 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, pp. 343–350. [https://doi.org/10.1016/0923-2508\(96\)84709-7](https://doi.org/10.1016/0923-2508(96)84709-7)
5. Goldberg L., Margalit J. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosq. News* 1977. Vol. 37, pp. 355–358.
6. Federici B.A., Park H., Bideshi D.K. Overview of the Basic Biology of *Bacillus thuringiensis* with Emphasis on Genetic Engineering of Bacterial Larvicides for Mosquito Control. *The Open Toxinology Journal*. 2010. Vol. 3, pp. 154–171.
7. Ben-Dov E. *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* and Its Dipteran-Specific Toxins. *Toxins*. 2014. Vol. 6, no. 4, pp. 1222–1243. <https://doi.org/10.3390/toxins6041222>
8. Insell J.P., Fitz-James P.C. Composition and Toxicity of the Inclusion of *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1985. Vol. 50, no. 1, pp. 56–62.
9. Zubasheva M., Smirnov Yu., Smirnova T., Azizbekyan R., Zhukhovitsky V., Yaminsky I. Nanostructure of protein crystals of *Brevibacillus laterosporus* bacteria. *Nanoindustry*. 2020. Vol. 13, no. 2, pp. 126–131. <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2020.13.2.126.131>
10. Ito S., Karnovsky M. Formaldehyde glutaraldehyde fixatives containing trinitrocompound. *J. Cell Biol.* 1969, Vol. 39, pp. 168a–169a.
11. Yaminsky I.V., Filonov A.S., Sinitsyna O.V., Meshkov G.B. FemtoScan Online software. *Nanoindustry*. 2016. no. 2, vol. 64. PP. 42–46. <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2016.64.2.42.46>
12. Yaminsky I.V., Gvozdev N.V., Sil'nikova M.I., Rashkovich L.N. Atomic force microscopy study of lysozyme crystallization. *Crystallography Reports*. 2002. Vol. 47, pp. S149–S158. <https://doi.org/10.1134/1.1529969>

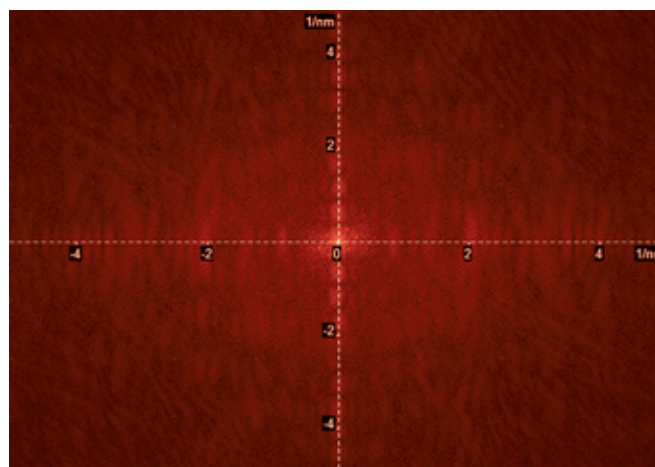


Рис.10. Фурье-образ участка изображения кристалла. Параметры кристаллической упаковки  $L = 3,23, 3,05$  и  $4,5$  нм. Шесть рефлексов расположены на сплюснутом эллипсе. Упаковка предположительно гексагональная  
 Fig.10. Fourier image of the crystal image section. Crystal packing parameters  $L = 3.23, 3.05$  and  $4.5$  nm. Six reflexes are located on a flattened ellipse. The packing is presumably hexagonal

1. the protein molecules that make up the crystal have an elongated shape;
2. it is a hardware effect (artefact).

The presence of several possible arrangements of protein crystals is observed, for instance, in the case of lysozyme. Under different crystallization conditions, a tetragonal or orthorhombic arrangement is obtained [12].

In the case of crystals *B1*, the presence of two packings shows that the biochemical composition of the inner compartment of the cell, where crystallization takes place, should differ more or less considerably. This observation shows that the inclusion of *B1* is similar to that of *Bti*.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The study was completed with the financial support of the RFBR and the London Royal Society No. 21-58-10005, RFBR, Project No. 20-32-90036, RSF, project No. 20-12-00389 and from the Foundation for the Promotion of Innovation, Project No. 71108.

#### 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.