

ГЕНОМИКА.
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 579.22:57.086.3

ИДЕНТИФИКАЦИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ ГРУППЫ *Bacillus cereus*
И ИХ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДАМИ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ
И ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ¹

© 2023 г. Т. А. Смирнова^a, Н. Б. Поляков^{a, b, *}, Д. С. Карпов^c, А. И. Соловьев^a, Н. В. Шевлягина^a,
С. Г. Андреевская^a, Д. Н. Щербинин^a, З. С. Плиева^a, В. А. Козлова^a, А. А. Переборова^a,
И. А. Богданов^{a, d}, Д. А. Грумов^a, М. В. Зубашева^a, С. В. Поддубко^e,
А. А. Гречников^b, М. А. Сухина^f, В. Г. Жуховицкий^{a, g}

^aНациональный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи
Минздрава России, Москва, 123098 Россия

^bИнститут геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского Российской академии наук,
Москва, 119334 Россия

^cЦентр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины,
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

^dООО “Нанопромимпорт”, Научный парк Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова,
Москва, 119234 Россия

^eИнститут медико-биологических проблем Российской академии наук, Москва, 123007 Россия

^fНациональный медицинский исследовательский центр колопроктологии им. А.Н. Рыжих
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 123423 Россия

^gРоссийская медицинская академия непрерывного профессионального образования (РМАНПО)
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 125993 Россия

*e-mail: polyakovnb@gmail.com

Поступила в редакцию 14.11.2022 г.

После доработки 23.12.2022 г.

Принята к публикации 30.12.2022 г.

Bacillus cereus – спорообразующая грамположительная, преимущественно почвенная бактерия. Споры *Bacillus* обладают чрезвычайно высокой устойчивостью не только к факторам окружающей среды, но и к различным воздействиям, в том числе к санитарной обработке. Загрязнение оборудования больниц и предприятий пищевой промышленности спорами токсинпродуцирующих штаммов *B. cereus* может представлять серьезную угрозу здоровью человека. Нами изучены два клинических изолята, идентифицированные как *B. cereus* и *B. cytotoxicus*. Показано, что содержание ионов кальция в этих изолятах достоверно ниже, чем у эталонных штаммов. По данным электронной микроскопии один из изолятов (SRCC 19/16) имеет увеличенный экзоспориум, а в изоляте SRCC 1208 при споруляции обнаруживаются крупные электронно-плотные включения неясной природы. Можно предположить, что SRCC 1208 содержит биологически активный компонент, обладающий цитотоксическим эффектом и, возможно, играющий определенную роль в патогенезе заболеваний, вызванных данным микроорганизмом. Проведен сравнительный химический, биохимический, физиологический и ультраструктурный анализ спор клинических изолятов и эталонных штаммов *B. cereus*. Полученные нами результаты углубляют представления о свойствах спор, вносящих вклад в повышенную патогенность представителей группы *B. cereus*.

Ключевые слова: *Bacillus cereus*, *Bacillus cytotoxicus*, спора, электронная микроскопия, масс-спектрометрия

DOI: 10.31857/S0026898423040201, EDN: QLYLNQ

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026898423040201 для авторизованных пользователей.

Сокращения: MALDI-TOF – времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией и ионизацией (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization–Time of Flight); ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия; СЭМ – сканирующая электронная микроскопия; СЭМ-ЭДР – сканирующая электронная микроскопия–энергодисперсионный рентгеновский анализ; MLSA – многолокусный анализ последовательностей (Multilocus Sequence Analysis); AFLP – анализ длин амплифицированных фрагментов (Amplified Fragment Length Polymorphism).

ВВЕДЕНИЕ

Bacillus cereus — это спорообразующая бактерия, часто встречающаяся в окружающей среде. Попадание *B. cereus* в продукты питания и на медицинское оборудование может приводить к развитию пищевых токсикоинфекций и таких серьезных заболеваний, как пневмония и менингит [1], а также сепсис и бактериемия [2].

Споруляция относится к наиболее важным фазам жизненного цикла спорообразующих бактерий. Эта фаза обычно сопровождается морфологическими и биохимическими изменениями бактериальных клеток. Процесс споруляции состоит из 7–8 стадий и заканчивается выходом спор из материнских клеток. Термостабильность спор и их устойчивость к ультрафиолетовому излучению и бактерицидным средствам может быть причиной заражения пищевых продуктов спорами, что ведет к инфицированию людей и животных. Наибольшую опасность представляет попадание спор в желудочно-кишечный тракт. Благодаря своей толерантности к желудочному содержимому и желчи, споры проходят неповрежденными через желудочно-кишечный тракт в тонкую кишку, где они впоследствии прорастают. Согласно опубликованным данным, вегетативные клетки и споры *B. cereus* прикрепляются к эпителию тонкой кишки с последующей ее колонизацией [3].

Вегетативные клетки *B. cereus* продуцируют гемолитические и негемолитические энтеротоксины, а также термостабильный энтеротоксин, ответственный за возникновение эметического синдрома. Анализ лабораторных штаммов *B. cereus* и изолятов, полученных от больных менингитом, позволил выделить два экотипа: вирулентный и авирулентный [4]. Такие экотипы можно обнаружить и у бацилл, выделенных из других источников.

Важная особенность спор микроорганизмов этой группы, в которую помимо *B. cereus* входят *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, — наличие экзоспориума — мембраны, контактирующей с внешней средой, и отделенной от мембраны споры экзоспориальной областью. Экзоспориум *B. cereus* состоит из базального слоя и наружного “ворсистого” слоя [5–7]. Споры *B. cereus* и *B. thuringiensis* имеют тонкие пилиподобные структуры, похожие на пили грамотрицательных бактерий, которые способствуют адгезии, как показано ранее [8]. Экзоспориум и пилиподобные структуры обеспечивают контакт спор с биологическими и искусственными поверхностями. Споры различных штаммов *B. cereus* характеризуются морфологической гетерогенностью. Анализ спор штаммов *B. cereus*, выделенных от человека с симптомами диареи, позволил предположить, что способность спор загрязнять продукты питания и оборудование пищевой промышленности обусловлены особенностями их поверхности [9].

Однако способность бацилл формировать споры имеет и положительные аспекты. Известно, что бациллы, выделенные из желудочно-кишечного тракта, хорошо приспособлены к выживанию в кишечнике, а значит, их можно рассматривать как потенциальные пробиотики и рекомендовать в качестве кандидатов для создания пероральных вакцин [8]. Именно по этой причине бациллы могут использоваться в фармацевтической промышленности. Способность некоторых штаммов влиять на качество пищевых продуктов предполагает возможность их применения в пищевой промышленности.

Количество видов спорообразующих бактерий, выделяемых из природных источников, постоянно растет. Увеличение числа близкородственных видов в группе *B. cereus* усложняет задачу их идентификации и внутрigrупповой дискриминации. Предложен ряд методов, обеспечивающих быструю и относительно точную идентификацию штаммов *B. cereus*. Эти методы можно условно разделить на три группы. К первой группе относятся генетические методы, с помощью которых штаммы идентифицируют на основе нуклеотидных последовательностей локуса рДНК (секвенирование 16S рДНК) [10], отдельных генов [11] или набора генов [12]. Во вторую группу входят протеомные методы, где идентификация бактериальных штаммов основана на информации о белках, и включает вестерн-блот-анализ антигенных белков [13] и времяпролетную масс-спектрометрию с матрично-активированной лазерной десорбцией и ионизацией (MALDI-TOF) [14–16]. К третьей группе относятся классические методы идентификации бактерий по морфологии и структуре поверхности вегетативных клеток и спор с использованием электронной микроскопии, энергодисперсионного рентгеновского анализа и атомно-силовой микроскопии [17].

В настоящей работе для идентификации и характеристики двух новых клинических изолятов *B. cereus* использована комбинация генетических, протеомных, биохимических и микроскопических подходов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штаммы. В экспериментах использовали два эталонных штамма: *B. cereus* ATCC 10876 и *B. cereus* NCTC 8035, и два клинических изолята, обозначенных как SRCC 19/16 и SRCC 1208, выделенных из фекалий пациента с язвенным колитом. Клинические изоляты любезно предоставлены Национальным медицинским исследовательским центром колопроктологии им. А.Н. Рыжих Минздрава России. Штаммы культивировали на агаризованной питательной среде NBY при 28°C в течение 12–96 ч.

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе

Ген	Нуклеотидная последовательность 5' → 3'	Ожидаемый размер, п.н.	Источник
<i>sspE</i>	GAGAAAGATGAGTAAAAACAACAA CATTTGTGCTTTGAATGCTAG	71	[18]
<i>sph1</i>	GGACAAAGTCAGCGTGCCGAT GAGCCATGATGTAACAGTCCA	771	Данная работа
<i>motB</i>	GGATCGCCTCGTTGGATGAC TGTGTCTGCATATCCTACCG	582	Данная работа
<i>spoIIIAB</i>	TTGGTGCAGTGTTAATCGTTG AGTAGCCCCGCTAGTACTCC	489	Данная работа

Идентификация штаммов *B. cereus* путем секвенирования характеристических генов. ДНК из всех штаммов выделяли с помощью набора Wizard Genomic DNA Purification Kit (“Promega”, США) в соответствии с инструкциями производителя. Фрагменты ДНК, кодирующие 16S РНК, амплифицировали с использованием вырожденных праймеров 27F 5'-AGAGTTTGGATGCTGGCTCAG-3' и 1492R 5'-TACCTTGTTTAYGACTT-3'. ПЦР проводили в смеси следующего состава: 2 мкл 10× буфера, 1 мкл dNTP (2.5 ммоль), 10 пмоль каждого праймера, 1 у.е. Taq-полимеразы (все “Силекс”, Россия), 1 мкл образца ДНК и деионизированной воды до 20 мкл. Условия ПЦР были следующими: денатурация при 94°C в течение 3 мин; затем 40 циклов: – 94°C – 30 с, 55°C – 30 с и 72°C – 90 с; элонгация – 72°C, 10 мин. Продукты ПЦР разделяли с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле (буфер TAE, бромистый этидий (0.5 мкг/мл), 5 В/см² в течение 60 мин), экстрагировали из геля с помощью набора QIAquick Gel Extraction Kit (“Qiagen”, США) и секвенировали по методу Сэнгера с использованием праймеров 27F и 1492R.

Близкородственные виды внутри группы *B. cereus* трудно дискриминировать только по 16S рДНК, поэтому для уточнения мы провели, во-первых, анализ длин амплифицированных фрагментов (AFLP) гена *sspE* [18, 19], а, во-вторых, многолокусный анализ последовательностей (MLSA) трех генов – *sph1* [20], *motB* [11, 21] и *spoIIIAB* [22]. Структуры используемых в работе праймеров приведены в табл. 1.

Амплифицированные фрагменты анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле, очищали и секвенировали по Сэнгеру. Нуклеотидные последовательности секвенированных фрагментов объединяли в искусственные химерные последовательности и использовали в поиске по базе данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) с использованием алгоритма MegaBlast [23] с параметрами, установленными по умолчанию. Далее строили деревья расстояний на основе парного

выравнивания BLAST с использованием метода Fast-Minimum Evolution.

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ). Споры визуализировали с помощью ТЭМ, используя негативное контрастирование препаратов. Суспензию спор распределяли на медной сетке, покрытой слоем формвара (“Serva”, США), затем окрашивали 1%-ным водным раствором уранилацетата. Для приготовления ультратонких срезов материала суспензию бактерий погружали в фиксатор, приготовленный по методу Ито–Карновского [24]. Затем материал фиксировали последовательно в 1%-ном водном растворе OsO₄ и в 1%-ном растворе уранилацетата на 0.2 М малеатном буфере pH 6. Материал последовательно обезвоживали в растворах 50, 70, 96 и 100%-ного этанола. Обезвоженный материал помещали в смесь 100%-ного этанола и смолы LR White, затем в чистую смолу LR White. Далее материал помещали в желатиновые капсулы со смолой и инкубировали в термостате при 56°C.

Ультратонкие срезы получали с помощью ультратомата LKB III (“LKB Bromma”, Швеция). Срезы контрастировали 1%-ным уранилацетатом в 70%-ном этаноле и 0.3%-ным цитратом свинца и анализировали на просвечивающих электронных микроскопах JEM-100B (“Jeol”, Япония), LEO 912 AB OMEGA (“Carl Zeiss”, Германия) при ускоряющем напряжении 80 кВ и JEM 2100 (“Jeol”) при ускоряющем напряжении 200 кВ.

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ). Перед исследованием на двухлучевом электронно-ионном сканирующем микроскопе Quanta 200 3D (“FEI Company”, США) клетки и споры *B. cereus* трижды отмывали от культуральной среды стерильной водой и фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине. Образцы отмываемых клеток и/или спор наносили на кремниевые подложки, которые закрепляли на алюминиевых столиках с помощью двусторонней углеродной клейкой ленты и напыляли золотом (толщина слоя золота 5 нм) в установке SPI-MODULE Sputter Coater (“SPI

Supplies”, США). СЭМ проводили в режиме высокого вакуума при ускоряющем напряжении 10 кВ.

Сканирующая электронная микроскопия – энергодисперсионный рентгеновский анализ (СЭМ-ЭДР). Для изучения элементного состава спор *B. cereus* образцы промывали в стерильной воде и фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине, после чего наносили на медные сетки с 300 ячейками (“SPI Supplies”) и на алюминиевые подложки. ЭДР-анализ проводили на двухлучевом электронно-ионном сканирующем микроскопе Quanta 200 3D, сопряженном с прибором EDAX Genesis XM4 с EDX-детектором (“EDAX”, США), в режиме низкого вакуума при ускоряющем напряжении 10 кВ. EDX-анализ проводили в 20 точках в течение 100 с. Данные регистрировали с использованием программного обеспечения EDAX Genesis (версия v.5.21) со следующими параметрами: частота измерений 1500–2000 в секунду, доля времени без измерений 20–40%, размер пятна 5 и рабочее расстояние 15 мм. В полученной спектрограмме удаляли пики меди и алюминия, так как эти элементы детектор улавливал как неспецифический фон с медной решетки и алюминиевых подложек. Дальнейшую обработку данных проводили с использованием Microsoft Office Excel 2007.

Масс-спектрометрия MALDI-TOF. Белки и пептиды экстрагировали, как описано Saueg и соавт. [25], с незначительными модификациями. Отдельные колонии микроорганизмов собирали с поверхности агара пластиковой микробиологической петлей объемом 1 мкл и ресуспендировали в 300 мкл деионизированной воды. К суспензии добавляли 900 мкл 96%-ного этанола, полученную смесь тщательно перемешивали и центрифугировали при 18894 g в течение 2 мин. Супернатант количественно отбирали, осадок подсушивали на воздухе. К высушенному осадку добавляли от 5 до 40 мкл 70%-ной муравьиной кислоты (в зависимости от объема осадка) и равный объем ацетонитрила. Полученную смесь центрифугировали при 18894 g в течение 2 мин. Супернатант, содержащий белковый экстракт, использовали в масс-спектрометрическом анализе.

На 386-луночную стальную мишень (“Bruker Daltonics”, Германия) наносили 1 мкл супернатанта и высушивали при комнатной температуре. На поверхность высушенного экстракта наносили 1 мкл раствора матрицы: насыщенный раствор α -циано-4-гидроксикоричной кислоты (“Sigma Aldrich”, США), содержащий 50% ацетонитрила и 2.5% трифторуксусной кислоты (“Panreac”, США), и также высушивали при комнатной температуре.

Масс-спектрометрический анализ проводили на приборе UltrafleXtreme (“Bruker Daltonics”), оснащенный Nd:Yag-лазером (355 нм) в линей-

ном режиме. Детектировали положительно заряженные ионы в диапазоне m/z от 2000 до 20000 при следующих настройках ионного источника: напряжение на IS1 20 кВ, на IS2 19 кВ, на линзах (параметр “Lens”) 4.5 кВ, напряжение питания детектора 2 885 В, коэффициент усиления 12.6.

Спектры снимали в автоматическом режиме с использованием программы Flex Control (v.3.4, build 135). Точки обстрела лазером на мишени выбирали случайным образом. Суммировали 1200 спектров с 200 точек обстрела при частоте лазера 2 кГц.

Библиотеки спектров каждого образца получали при анализе триплекатов восьми технических повторов. Калибровочным стандартом (кат. номер 255 343, “Bruker Daltonics”) и положительным контролем служил белковый экстракт *Escherichia coli* DH5 α с дополнительными белками (PHКаза А [M + H]⁺ 13683.2 Да, миоглобин [M + H]⁺ 16952.3 Да)

Полученные спектры обрабатывали с помощью программного комплекса MALDI biotyper Compass Explorer 4.1 (“Bruker Daltonics”) с использованием стандартного метода препроцессинга данных (Biotyper Preprocessing Standard Method). Обработанные спектры образцов сравнивали с референсной базой характеристических спектральных профилей, включающей 6905 записей. Результаты поиска характеристического профиля выражали как логарифм значений. Значения ниже 1.699 соответствовали ненадежному определению рода; 1.700–1.999 – надежному определению рода и, возможно, вида; 2.000–2.299 – надежному определению рода, с высокой вероятностью вида и, наконец, значения 2.300–3.000 соответствовали надежной идентификации до вида.

Дендрограммы составляли с помощью программного обеспечения MALDI-biotyper Compass Explorer 4.1 (“Bruker Daltonics”); дополнительный анализ масс-спектров проводили с помощью программного обеспечения ClinProTools 3.0 (“Bruker Daltonics”).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты MALDI-TOF-анализа указывают на принадлежность клинических изолятов к группе *B. cereus*.

Первичную идентификацию клинических изолятов проводили с помощью масс-спектрометрического анализа MALDI-TOF (табл. 2). Согласно полученным результатам, исследуемые клинические изоляты можно надежно отнести к роду *Bacillus*. Дендрограмма, построенная на основе масс-спектрометрических данных, также свидетельствует о том, что клинические изоляты ближе к штаммам *B. cereus* (рис. S1, см. Дополнительные материалы на сайте http://www.molec-bio.ru/downloads/2023/4/supp_Smirnova_rus.pdf),

Таблица 2. Результат идентификации клинических изолятов методом MALDI-TOF

Штамм	Наиболее близкий штамм	Надежность идентификации ^а
Клинический изолят SRCC 19/16	<i>B. cereus</i> DSM 31T DSM	1.81
Клинический изолят SRCC 1208	<i>B. cereus</i> 4080 LBK	2.21
<i>B. cereus</i> ATCC 10876	<i>B. cereus</i> 4080 LBK	2.08
<i>B. cereus</i> NCTC 8035	<i>B. cereus</i> 4080 LBK	2.06

^аПриведено значение интегральной количественной оценки надежности идентификации штамма (см. раздел “Экспериментальная часть”).

включая использованные в работе штаммы ATCC10876 и NCTC8035. Однако в эту группу входят также близкородственные виды *B. cereus sensu lato*, такие как *B. cytotoxicus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycooides*, *B. thuringiensis* и *B. weihenstephanensis*, которые трудно дифференцировать [26]. Хотя в последних работах определены биомаркерные пики для *B. anthracis* [27], *B. cereus* и *B. thuringiensis* [28], в целом, анализ MALDI-TOF имеет слабую разрешающую способность, позволяя надежно идентифицировать только некоторые виды *Bacilli* [29]. Более того, MALDI-TOF-спектры *Bacilli* сильно зависят от условий роста и от присутствия спор в анализируемом образце [29], поэтому для более надежной идентификации наших клинических изолятов мы использовали другие методы.

Анализ последовательностей характеристических генов показывает, что один из клинических изолятов может принадлежать виду B. cytotoxicus

Секвенирование фрагментов 16S рДНК клинических образцов и эталонных штаммов с последующим поиском в базе данных NCBI с помощью BLAST подтвердило принадлежность патогенных штаммов к роду *Bacillus* (табл. 3). Нуклеотидные последовательности 16S рДНК штаммов SRCC 1208, ATCC10876 и NCTC8035 совпадают преимущественно с последовательностями штаммов *B. cereus*. В число близких видов входят также *B. thuringiensis* и *B. anthracis*. Однако изолят SRCC 19/16 проявляет наибольшее сходство с *B. cytotoxicus*, а штамм *B. cereus* находится только на 11-й позиции. Ранее показали, что очень высокое сходство последовательностей 16S рДНК затрудняет дискриминацию таких видов, как *B. cereus*, *B. anthracis* и *B. thuringiensis* [30].

Для более точной идентификации клинических штаммов использовали последовательности тех же генов, как и при определении видовой принадлежности штаммов из группы *B. cereus*, а именно *sspE* [18, 19], *sph1* [20], *motB* [11, 21] и *spoIIIAB* [22]. Так, фрагменты гена *sspE* всех четырех штаммов имеют длину 71 п.н., а не 188 п.н. (рис. 1), характерную для штаммов *B. anthracis* [18, 19]. ПЦР-фрагменты генов *motB*, *spoIIIAB* и *sph1* секвенировали,

объединяли в искусственные химерные последовательности и использовали в BLAST-поиске. Согласно полученным результатам (табл. 4), наилучшие совпадения получены для штаммов *B. cereus*. Исследуемые клинические изоляты расположены ближе к штаммам *B. cereus* и в соответствующих деревьях расстояний (рис. S2, см. Дополнительные материалы на сайте http://www.molec-bio.ru/downloads/2023/4/supp_Smirnova_rus.pdf).

Физиологические и биохимические тесты указывают на то, что SRCC 19/16 это скорее B. cereus, чем B. cytotoxicus

С использованием физиологических и биохимических тестов, описанных в [31], получены данные, позволяющие отнести изолят SRCC

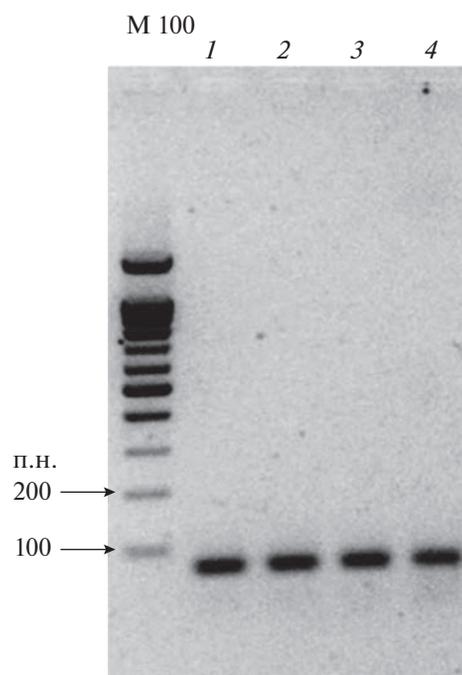


Рис. 1. Электрофореграмма разделения продуктов амплификации участка гена *sspE*, использованного в идентификации штаммов *B. cereus* с помощью AFLP. М100 – маркер молекулярной массы ДНК. 1 – Изолят SRCC 19/16; 2 – изолят SRCC 1208; 3 – *B. cereus* ATCC 10876; и 4 – *B. cereus* NCTC 8035.

Таблица 3. Поиск сходных последовательностей 16S РНК в базе данных NCBI с помощью BLAST

Штамм/Изолят	Штаммы с наиболее сходными фрагментами 16S РНК	Общий балл*	Идентификатор NCBI
SRCC 1208	<i>B. cereus</i> штамм DBM-Z6	1574	MT321509.1
	<i>B. cereus</i> group sp. штамм YP20170200	1574	MT312782.1
	<i>B. cereus</i> штамм EB14	1574	MT256104.1
	<i>B. cereus</i> штамм EB2	1574	MT256102.1
	<i>B. cereus</i> штамм D85	1574	MT256066.1
SRCC 19/16	<i>B. cytotoxicus</i> штамм CH_1	20287	CP024120.1
	<i>B. cytotoxicus</i> штамм CH_2	20320	CP024116.1
	<i>B. cytotoxicus</i> штамм CH_3	20320	CP024113.1
	<i>B. cytotoxicus</i> штамм CH_4	20325	CP024111.1
	<i>B. cytotoxicus</i> штамм CH_13	18744	CP024109.1
	<i>B. cytotoxicus</i> штамм CH_15	20325	CP024107.1
	<i>B. cytotoxicus</i> штамм CH_23	20287	CP024104.1
	<i>B. cytotoxicus</i> штамм CH_25	20287	CP024101.1
	<i>B. cytotoxicus</i> штамм CH_38	20325	CP024098.1
	<i>B. cytotoxicus</i> штамм CH_39	20320	CP024096.1
	<i>B. cereus</i> штамм UCCB 148	1570	MH193385.1
ATCC 10876	<i>B. cereus</i> F837/76	2293	CP003187.1
	<i>B. cereus</i> 03BB108	2193	CP009641.1
	<i>B. thuringiensis</i> штамм Al Hakam	2187	CP000485.1
	<i>B. thuringiensis</i> штамм HD571	2187	CP009600.1
	<i>B. anthracis</i> штамм MCCC 1A02161	2176	CP031642.1
NCTC8035	<i>B. cereus</i> штамм DBM-Z6	1546	MT321509.1
	<i>B. cereus</i> group sp. штамм YP20170200	1546	MT312782.1
	<i>B. cereus</i> штамм EB14	1546	MT256104.1
	<i>B. cereus</i> штамм D85	1546	MT256066.1
	<i>B. thuringiensis</i> штамм 8C5-13	1546	MK603121.1

*Общий балл (total-score) – сумма баллов выравнивания всех найденных сегментов одной и той же последовательности в базе данных, которые соответствуют последовательности, заданной в поиске (вычисляется по всем сегментам).

19/16 к *B. cytotoxicus* или к *B. cereus*. Согласно этим данным (табл. 5), по ряду биохимических свойств SRCC 19/16 более сходен с *B. cereus*, нежели с *B. cytotoxicus*, однако следует отметить, что клетки данного штамма не растут при 10°C, что должно быть характерным для *B. cytotoxicus*.

Различия в химическом составе спор Bacilli, выявленные с помощью сканирующей электронной микроскопии – энергодисперсионного рентгеновского анализа (СЭМ-ЭДР)

Поскольку исследуемые изоляты были выделены из клинических образцов, интерес представляли химические, биохимические, физиологические и структурные особенности их спор, способные вносить вклад в патогенную природу изолятов. В ходе анализа с помощью СЭМ-ЭДР в

спорах эталонных штаммов *B. cereus* ATCC 10876, *B. cereus* NCTC 8035 и в клиническом изоляте SRCC 1208 выявили элементы С, N, O, Na, Mg, Si, P, S, Cl и Ca (табл. 6). Элементы С, N, O, Na, Mg, Si, P, S, Cl, Ca, К обнаружены в клиническом изоляте SRCC 19/16. Отметим сниженное содержание ионов кальция в обоих клинических изолятах. Опубликованы данные о влиянии кальция на термоустойчивость *B. cereus* [32]. Интересно, что калий обнаружен лишь в изоляте SRCC 19/16. Имеются данные о том, что калий может влиять на активность токсинов *B. cereus* [33].

Характеристика спор с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ)

Для описания внешней структуры спор исследуемых штаммов использовали СЭМ (результаты

Таблица 4. Поиск сходных химерных последовательностей *motB-spoIIIВ-sph1* в базе данных NCBI с помощью BLAST

Штамм/Изолят	Штаммы с наиболее близкими химерными последовательностями <i>motB-spoIIIВ-sph1</i>	Общий балл*	Идентификатор NCBI
SRCC19/16	<i>Bacillus</i> sp. ABP14	1475	CP017016.1
	<i>B. cereus</i> E33L	1459	CP009968.1
	<i>B. cereus</i> штамм JEM-2	1437	CP018935.1
	<i>B. cereus</i> штамм ISSFR-9F	1437	CP018933.1
	<i>B. cereus</i> штамм ISSFR-3F	1437	CP018931.1
SRCC 1208	<i>Bacillus</i> sp. ABP14	1527	CP017016.1
	<i>B. cereus</i> E33L	1516	CP009968.1
	<i>B. cereus</i> штамм JEM-2	1483	CP018935.1
	<i>B. cereus</i> штамм ISSFR-9F	1483	CP018933.1
	<i>B. cereus</i> штамм ISSFR-3F	1483	CP018931.1
ATCC 10876	<i>B. cereus</i> F837/76	2293	CP003187.1
	<i>B. cereus</i> 03BB108	2193	CP009641.1
	<i>B. thuringiensis</i> штамм Al Nakam	2187	CP000485.1
	<i>B. thuringiensis</i> штамм HD571	2187	CP009600.1
	<i>B. anthracis</i> штамм MCCC 1A02161	2176	CP031642.1
NCTC 8035	<i>B. cereus</i> штамм 25	1874	CP020803.1
	<i>B. cereus</i> Q1	1529	CP000227.1
	<i>B. paranthracis</i> штамм CFSAN068816	1523	CP045777.1
	<i>B. cereus</i> штамм CC-1	1523	CP023179.1
	<i>B. cereus</i> NC7401	1523	AP007209.1

*Общий балл (total-score) – сумма баллов выравнивания всех найденных сегментов одной и той же последовательности в базе данных, которые соответствуют последовательности, заданной в поиске (вычисляется по всем сегментам).

Таблица 5. Физиологические и биохимические свойства клинических изолятов

Признак	<i>B. cytotoxicus</i> , согласно [31]	<i>B. cereus</i> , согласно [31]	Штамм		
			ATCC 10876	NCTC 8035	SRCC 19/16
Использование цитрата	– [33%] ^a	+ [34%]	+	+	+
Гидролиз крахмала	–	+ [67%]	+	+	+
Температура роста: минимальная максимальная	20°C	10°C	– (10°C) + (20°C)	– (10°C) + (20°C)	– (10°C) + (20°C)
	50°C	45°C	– (50°C) + (45°C)	– (50°C) + (45°C)	– (50°C) + (45°C)

^aУказан процент положительных штаммов среди всех протестированных согласно [31]; + обнаружен рост; – нет роста.

представлены на рис. 2). Споры эталонного штамма *B. cereus* ATCC 10876 имели овальную форму, каждая спора окружена экзоспориумом. Средняя длина спор вместе с экзоспориумом составила 1.94 ± 0.05 мкм. Споры эталонного штамма *B. cereus* NCTC 8035 также имели овальную форму, были окружены экзоспориумом и были в среднем более короткими, чем у ATCC 10876 (1.75 ± 0.04 мкм). Наименьшая длина спор зафик-

сирована у клинического изолята SRCC 1208 (1.55 ± 0.11 мкм). В отличие от других штаммов споры клинического изолята SRCC 19/16 имели наибольшую длину – 2.17 ± 0.05 мкм, что связано с увеличенным размером экзоспориума. Учитывая большое значение экзоспориума в молекулярных механизмах патогенеза *Bacilli* [6], увеличение его размеров связано, возможно, с патогенным потенциалом спор этого клинического изолята.

Таблица 6. Содержание элементов в спорах эталонных штаммов *B. cereus* и клинических изолятов*

Элемент	<i>B. cereus</i> ATCC 10876	<i>B. cereus</i> NCTC 8035	SRCC 1208	SRCC 19/16
C	59.3 ± 3.3	55.4 ± 2.5	56.0 ± 2.3	49.4 ± 2.1
N	17.3 ± 2.7	18.4 ± 2.6	20.2 ± 1.6	21.0 ± 1.0
O	16.0 ± 0.9	14.8 ± 1.5	17.3 ± 1.1	19.4 ± 1.5
Na	1.5 ± 0.9	2.0 ± 0.9	1.2 ± 0.8	3.1 ± 1.5
Mg	0.7 ± 0.6	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.3	0.8 ± 0.8
Si	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.5	0.4 ± 0.3	0.2 ± 0.1
P	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.8 ± 0.2	0.6 ± 0.2
S	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1
Cl	0.4 ± 0.1	2.6 ± 1.0	0.5 ± 0.2	2.1 ± 1.2
K	Abs	Abs	Abs	0.6 ± 0.3
Ca	3.1 ± 0.8	4.3 ± 0.5	2.8 ± 0.3	2.4 ± 0.8

*Содержание выражено в весовых процентах (мас. %).

Примечание. Данные представлены в виде среднего ± стандартное отклонение. Abs – нет данных.

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЕМ) спор клинических изолятов

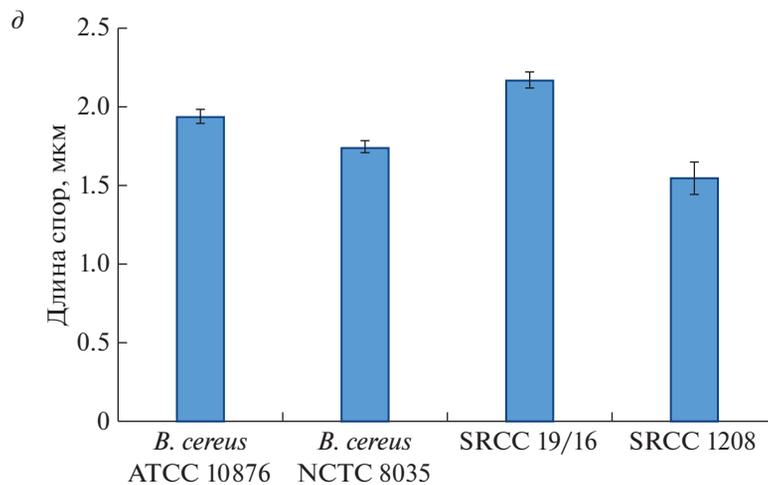
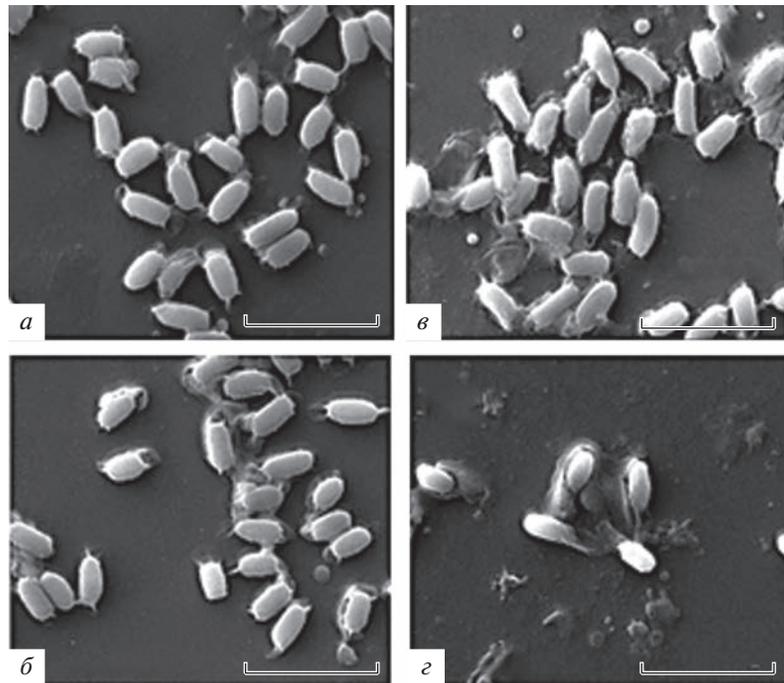
Ультраструктурные особенности спор клинических изолятов, ассоциированных с их патогенным потенциалом, изучали с помощью электронной микроскопии. На рис. 3 представлена электронная микрофотография зрелой споры эталонного штамма *B. cereus* ATCC 10876 после негативного окрашивания. Отметим, что споры всех исследованных штаммов имеют сходную структуру. Спора обладает внешней оболочкой – экзоспориумом, который состоит из базальной мембраны и ворсистого слоя. От поверхности спор отходят длинные нитевидные структуры, которые напоминают пили грамотрицательных бактерий.

Путем микроскопирования ультратонких срезов изучали также динамику формирования спор (от 12 до 96 ч) у исследуемых штаммов. Начало споруляции у всех штаммов сопровождалось формированием электронно-прозрачных включений полигидроксibuтирата, которые сохранялись на срезах спорообразующих клеток и на последующих фазах споруляции. Дальнейшие наблюдения подтвердили типичный цикл споруляции *B. cereus*: последовательно отмечалось формирование споровой перегородки, проспоры, экзоспориума, оболочки споры, кортекса споры, ядра и, наконец, зрелой споры. Экзоспориум формируется на внешней мембране споры и, вытягиваясь, образует отсек, занимающий часть родительской клетки, внутри которого продолжается синтез и сборка структур споры. В этом отсеке вновь синтезированные структуры споры защищены от лизиса. Пространство экзоспориума зрелых спор эталонного штамма ATCC 10876 не содержит

включений (рис. 4а). Поверхность спор тонкая, электронно-плотная. Электронно-прозрачный кортекс окружает ядро споры, содержащее наследственный материал (рис. 4а, 4б). На рис. 2б представлен аксиальный срез эталонного штамма NCTC 8035 на стадии созревания споры и формирования экзоспориума. Видно, что экзоспориум занимает небольшую часть цитоплазмы родительской клетки.

У клинического изолята SRCC 1208 наблюдали отличия в формировании экзоспориума. Мембрана экзоспориума, которая начинается от созревающей споры, удлиняется и продвигается к противоположному полюсу материнской клетки. Это ведет к формированию довольно длинного и узкого клиновидного отсека экзоспориума (рис. 5а). Можно отметить также складчатость мембраны экзоспориума, которая исчезает через 96 ч, и значительно больший объем экзоспориума, позволяющий разметить внутри него необычное крупное, округлое или аморфное включение, что структуры, уникальной для спор данного клинического изолята (рис. 5б–5г). С помощью электронной микроскопии с высокой проникающей способностью электронного пучка установлено, что оболочка включения слоистая, а содержимое – зернистое (рис. 5г). В настоящее время не ясно из чего состоит это включение и связано ли оно с патогенезом.

В целом споры клинического изолята SRCC 19/16 похожи на споры эталонных штаммов *B. cereus*. Наблюдали спорующие клетки с многочисленными электронно-прозрачными круглыми включениями полигидроксibuтирата, характерными для этой группы бацилл (рис. 6а).



e

Штамм	<i>B. cereus</i> ATCC 10876	<i>B. cereus</i> NCTC 8035	SRCC 19/16
<i>B. cereus</i> ATCC 10876	—	—	—
<i>B. cereus</i> NCTC 8035	Q = 3.00 ($p = 0.15587$)	—	—
SRCC 19/16	Q = 3.65 ($p = 0.05629$)	Q = 6.65 ($p = 0.00007$)	—
SRCC 1208	Q = 6.11 ($p = 0.00027$)	Q = 3.11 ($p = 0.13276$)	Q = 9.76 ($p = 0.00000$)

Рис. 2. Изображения спор штаммов *B. cereus*, полученные с помощью СЭМ. *а* – *B. cereus* ATCC 10876 (эталонный штамм). *б* – *B. cereus* NCTC 8035 (эталонный штамм). *в* – SRCC 19/16 (клинический изолят). *г* – SRCC 1208 (клинический изолят). *д* – Оценка длины спор исследуемых штаммов. Масштаб – 5 мкм. Длину спор определяли с помощью программы ImageJ. Данные представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего, количество измерений варьирует от 6 до 27. *е* – Оценка статистической значимости различий в длинах спор с помощью теста ANOVA, приведены значения статистики Q и значение p для попарных сравнений с поправкой на множественное сравнение.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе исследованы два клинических изолята, которые относятся к группе близкородственных видов *B. cereus* и идентифи-

цированы нами как *B. cereus* и *B. cytotoxicus* на основании анализа последовательностей характеристических генов в сочетании с биохимическими и физиологическими тестами.

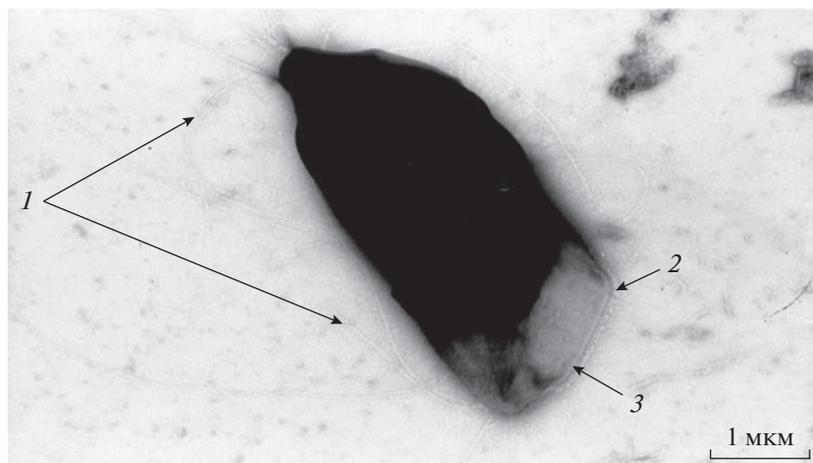


Рис. 3. Электронная микрофотография зрелой споры *B. cereus* ATCC 10876 при негативном окрашивании. Цифрами обозначены: 1 – пилиподобные структуры; 2 – ворсистый слой экзоспориума; 3 – базальный слой экзоспориума.

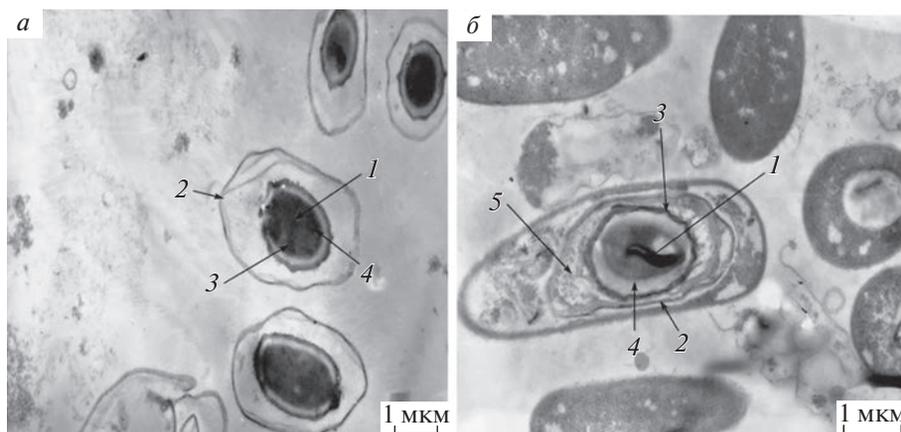


Рис. 4. Электронные микрофотографии ультратонких срезов спор эталонных штаммов: а – *B. cereus* ATCC 10876 и б – *B. cereus* NCTC 8035. Цифрами обозначены: 1 – центральная часть споры; 2 – экзоспориум; 3 – оболочка споры; 4 – кортекс; 5 – внутреннее пространство экзоспориума. Масштабная линейка – 1 мкм.

В ходе дальнейшего изучения клинических изолятов установлено, что содержание ионов кальция в них достоверно ниже, чем у эталонных штаммов. Недавно показано, что при прорастании спор *B. cereus* в среде, обогащенной кальцием, снижается устойчивость клеток к термической обработке [32]. В спорах изолята SRCC 19/16, в отличие от спор других штаммов, обнаружены ионы калия. Опубликованные данные указывают на то, что повышенная активность некоторых токсинов, продуцируемых *B. cereus*, связана с их сродством к ионам калия [33]. Можно предположить, что за счет ионов калия изолят SRCC 19/16 может проявлять повышенную цитотоксичность по сравнению с другими штаммами. Споры этого изолята более удлиненные, поскольку они имеют увеличенный экзоспориум. Экзоспориум играет важную роль в молекулярных патогенетических механизмах *Bacilli* [6], обеспечивая контакт с клетками хозяина. Возможно, увеличение разме-

ров экзоспориума указывает на изменения его структуры, повышающие патогенный потенциал спор клинического изолята. Что касается ультратонкой структуры спор изолята SRCC 19/16, то она не отличается от структуры эталонных штаммов. Интересно отметить, что у изолята SRCC 1208 в ходе споруляции формируется удлиненный и более вместительный экзоспориум, внутри которого затем появляется крупное электронно-плотное включение неясной природы. Эти включения не похожи на известные электронно-плотные кристаллические включения правильной формы, такие как кристаллы Стру-токсинов *B. thuringiensis* [5, 34] и белковые кристаллы других штаммов рода *Bacillus* [35, 36]. Можно предположить, что наблюдаемые включения похожи на параспоровые кристаллы неправильной формы, имеющие белковую природу и обнаруживаемые у некоторых бактерий, например *Paenibacillus popilliae* [37]. В штаммах *B. thuringiensis*, не обладающих инсек-

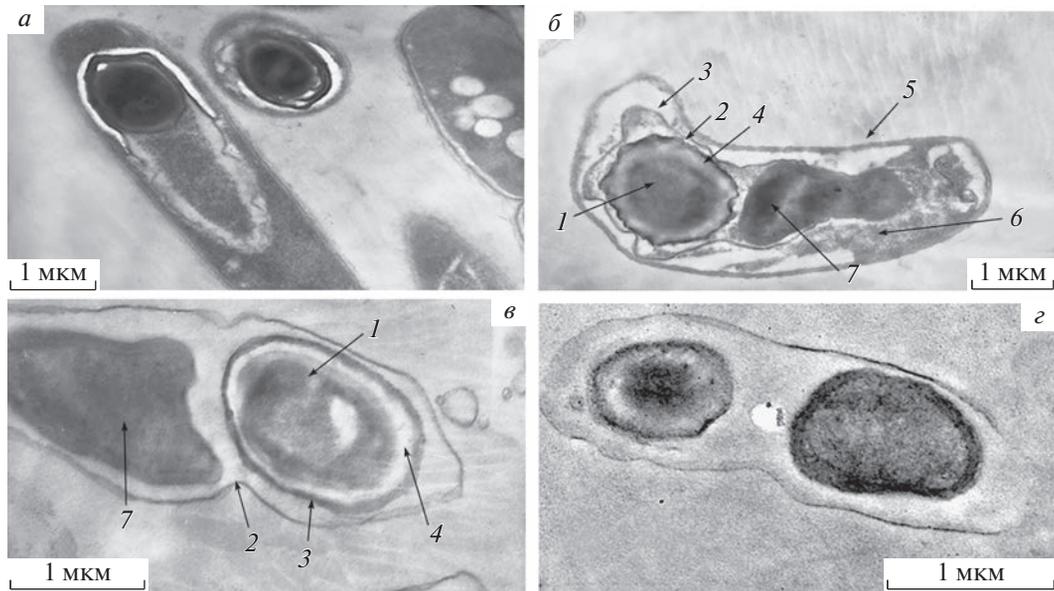


Рис. 5. Электронные микрофотографии ультратонких срезов спор клинического изолята SRCC 1208. *а* – Образование экзоспориума. *б* – Зрелая спора с крупным включением внутри материнской клетки. *в* – Зрелая спора с крупным включением внутри экзоспориума. *з* – Фотография зрелой споры, полученная с помощью высоковольтной электронной микроскопии высокого разрешения с высокой проникающей способностью электронного пучка (200 кВ). Цифрами обозначены: 1 – центральная часть споры; 2 – экзоспориум; 3 – оболочка споры; 4 – кортекс; 5 – клеточная стенка; 6 – цитоплазма родительской клетки; 7 – включение неизвестной природы. Масштабная линейка 1 мкм.

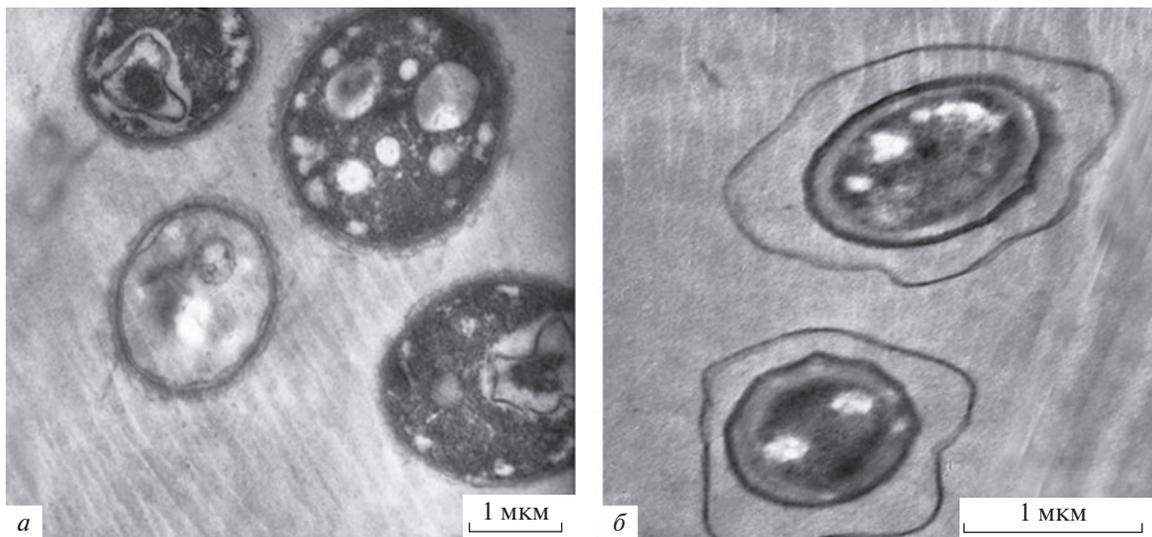


Рис. 6. Электронные микрофотографии ультратонких срезов спор клинического изолята SRCC 19/16. *а* – Спорующие клетки с включениями полигидроксибутирата. *б* – Зрелая спора. Масштабная линейка 1 мкм.

тицидным действием, обнаружены крупные электронно-плотные кристаллы неправильной формы, имеющие оболочку [38]. Эти кристаллы образованы белком параспорином, который после расщепления протеазами проявляет сильный цитотоксический эффект в отношении клеток человека [38]. Учитывая, что похожие по форме включения обнаружены нами в клиническом изоляте, можно предположить, что они также сформированы белком, обладающим цитотокси-

ческим действием и участвующим в патогенезе. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы установить компоненты этих уникальных включений и их связь с патогенностью клинических изолятов.

Авторы выражают благодарность А.В. Моисенко за техническую поддержку, а также А.В. Рубцову, К.В. Рубцовой и М.С. Золотухину за помощь в подготовке публикации. Авторы выражают также благодарность Центру высокоточного ре-

дактирования генома и генетических технологий для биомедицины ИМБ РАН за предоставленные вычислительные мощности и методики для анализа данных.

Часть работы выполнена на оборудовании ЦКП “Геном” ИМБ РАН (http://www.eimb.ru/RUS-SIAN_NEW/INSTITUTE/ccu_genome_c.php).

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Контракт в системе электронный бюджет № 075-10-2021-113, ID проекта: RF----193021X0001).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Savini V. (2016) In: *The Diverse Faces of Bacillus cereus*. Ed. Savini V. Elsevier Acad. Press, pp. 73–84.
- Kuroki R., Kawakami K., Qin L., Kaji C., Watanabe K., Kimura Y., Ishiguro C., Tanimura S., Tsuchiya Y., Hamaguchi I., Sakakura M., Sakabe S., Tsuji K., Inoue M., Watanabe H. (2009) Nosocomial bacteremia caused by biofilm-forming *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Intern. Med.* **48**(10), 791–796.
- Elshagabee F.M.F., Rokana N., Gulhane R.D., Sharma C., Panwar H. (2017) *Bacillus* as potential probiotics: status, concerns, and future perspectives. *Front. Microbiol.* **8**, 1490.
- Bundy J.G., Willey T.L., Castell R.S., Ellar D.J., Brindle K.M. (2005) Discrimination of pathogenic clinical isolates and laboratory strains of *Bacillus cereus* by NMR-based metabolomic profiling. *FEMS Microbiol. Lett.* **242**(1), 127–136.
- Smirnova T.A., Zubasheva M.V., Shevlyagina N.V., Nikolaenko M.A., Azizbekyan R.R. (2013) Electron microscopy of the surfaces of *Bacillus* spores. *Microbiology.* **82**(6), 713–720.
- Stewart G.C. (2015) The exosporium layer of bacterial spores: a connection to the environment and the infected host. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **79**(4), 437–457.
- Ball D.A., Taylor R., Todd S.J., Redmond C., Couture-Tosi E., Sylvestre P., Moir A., Bullough P.A. (2008) Structure of the exosporium and sublayers of spores of the *Bacillus cereus* family revealed by electron crystallography. *Mol. Microbiol.* **68**(4), 947–958.
- Smirnova T.A., Poglazova M.N., Nikolaenko M.A., Azizbekyan R.R. (2000) The adhesion characteristics of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnologia.* **3**, 16–26.
- Hoang N.T., Baccigalupi L., Huxham A., Smertenko A., Van P.H., Ammendola S., Ricca E., Cutting A.S. (2000) Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophyllaxis of gastrointestinal disorders. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(12), 5241–5247.
- Daffonchio D., Raddadi N., Merabishvili M., Cherif A., Carmagnola L., Brusetti L., Rizzi A., Chanishvili N., Visca P., Sharp R., Borin S. (2006) Strategy for identification of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains closely related to *Bacillus anthracis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**(2), 1295–1301.
- Chelliah R., Wei S., Park B.J., Kim S.H., Park D.S., Kim S.H., Hwan K.S., Oh D.H. (2017) Novel *motB* as a potential predictive tool for identification of *B. cereus*, *B. thuringiensis* and differentiation from other *Bacillus* species by triplex real-time PCR. *Microb. Pathog.* **111**, 22–27.
- Olsen J.S., Skogan G., Fykse E.M., Rawlinson E.L., Tomaso H., Granum P.E., Blatny J.M. (2007) Genetic distribution of 295 *Bacillus cereus* group members based on *adk*-screening in combination with MLST (Multilocus Sequence Typing) used for validating a primer targeting a chromosomal locus in *B. anthracis*. *J. Microbiol. Methods.* **71**(3), 265–274.
- Phillips A.P., Ezzell J.W. (1989) Identification of *Bacillus anthracis* by polyclonal antibodies against extracted vegetative cell antigens. *J. Appl. Bacteriol.* **66**(5), 419–432.
- Clark A.E., Kaleta E.J., Arora A., Wolk D.M. (2013) Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* **26**(3), 547–603.
- Keys C.J., Dare D.J., Sutton H., Wells G., Lunt M., McKenna T., McDowall M., Shah H.N. (2004) Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases. *Infect. Genet. Evol.* **4**(3), 221–242.
- Laue M., Fulda G. (2013) Rapid and reliable detection of bacterial endospores in environmental samples by diagnostic electron microscopy combined with X-ray microanalysis. *J. Microbiol. Methods.* **94**(1), 13–21.
- Васильченко А.С., Яруллина Д.Р., Никиян А.Н., Тесля А.В. (2012). Морфофункциональные характеристики бактерий *Bacillus cereus* на различных этапах жизненного цикла. *Вестн. Оренбургского гос. университета.* **10**(146), 66–71.
- Kim K., Seo J., Wheeler K., Park C., Kim D., Park S., Kim W., Chung S.I., Leighton T. (2005) Rapid genotypic detection of *Bacillus anthracis* and the *Bacillus cereus* group by multiplex real-time PCR melting curve analysis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **43**(2), 301–310.
- Abriouel H., Ben Omar N., Lucas Lopez R., Martinez Canamero M., Ortega E., Galvez A. (2007) Differentiation and characterization by molecular techniques of *Bacillus cereus* group isolates from poto poto and degue, two traditional cereal-based fermented foods of Burkina Faso and Republic of Congo. *J. Food Prot.* **70**(5), 1165–1173.
- Hsieh Y.M., Sheu S.J., Chen Y.L., Tsen H.Y. (1999) Enterotoxigenic profiles and polymerase chain reaction detection of *Bacillus cereus* group cells and *B. cereus* strains from foods and food-borne outbreaks. *J. Appl. Microbiol.* **87**(4), 481–490.
- Oliwa-Stasiak K., Molnar C.I., Arshak K., Bartoszcze M., Adley C.C. (2010) Development of a PCR assay for identification of the *Bacillus cereus* group species. *J. Appl. Microbiol.* **108**(1), 266–273.
- Ehling-Schulz M., Svensson B., Guinebretiere M.H., Lindback T., Andersson M., Schulz A., Fricker M., Christiansson A., Granum P.E., Martlbauer E., Nguyen-The C., Salkinoja-Salonen M., Scherer S. (2005) Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to

- a single evolutionary lineage of closely related strains. *Microbiology (Reading)*. **151**(Pt 1), 183–197.
23. Morgulis A., Coulouris G., Raytselis Y., Madden T.L., Agarwala R., Schaffer A.A. (2008) Database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinformatics*. **24**(16), 1757–1764.
 24. Ito S. (1968) Formaldehyde–glutaraldehyde fixatives containing tri nitro compounds. *J. Cell Biol.* **39**, 168A–169A.
 25. Sauer S., Freiwald A., Maier T., Kube M., Reinhardt R., Kostrzewa M., Geider K. (2008) Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. *PLoS One*. **3**(7), e2843.
 26. Liu Y., Lai Q., Goker M., Meier-Kolthoff J.P., Wang M., Sun Y., Wang L., Shao Z. (2015) Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. *Sci. Rep.* **5**, 14082.
 27. Sauer V.I., Thoma B.R., Grass G., Bleichert P., Hanczaruk M., Zoller L., Zange S. (2018) Improved discrimination of *Bacillus anthracis* from closely related species in the *Bacillus cereus sensu lato* group based on matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **56**(5), e01900–e01917.
 28. Ha M., Jo H.J., Choi E.K., Kim Y., Kim J., Cho H.J. (2019) Reliable identification of *Bacillus cereus* group species using low mass biomarkers by MALDI-TOF MS. *J. Microbiol. Biotechnol.* **29**(6), 887–896.
 29. Shu L.-J., Yang Y.-L. (2017) *Bacillus* classification based on matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry – effects of culture conditions. *Sci. Repts.* **7**(1), 15546–15546.
 30. Bourque S.N., Valero J.R., Lavoie M.C., Levesque R.C. (1995) Comparative analysis of the 16S to 23S ribosomal intergenic spacer sequences of *Bacillus thuringiensis* strains and subspecies and of closely related species. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(4), 1623–1626.
 31. Guinebretiere M.H., Auger S., Galleron N., Contzen M., De Sarrau B., De Buyser M.L., Lamberet G., Fagerlund A., Granum P.E., Lereclus D., De Vos P., Nguyen-The C., Sorokin A. (2013) *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**(Pt 1), 31–40.
 32. Sinnela M.T., Pawluk A.M., Jin Y.H., Kim D., Mah J.H. (2021) Effect of calcium and manganese supplementation on heat resistance of spores of *Bacillus* species associated with food poisoning, spoilage, and fermentation. *Front. Microbiol.* **12**, 744953.
 33. Teplova V.V., Mikkola R., Tonshin A.A., Saris N.E., Salkinoja-Salonen M.S. (2006) The higher toxicity of cereulide relative to valinomycin is due to its higher affinity for potassium at physiological plasma concentration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **210**(1–2), 39–46.
 34. Osman G., Already R., Assaedi A., Organji S., El-Ghareeb D., Abulreesh H., Althubiani A. (2015) Bioinsecticide *Bacillus thuringiensis* a comprehensive review. *Egyptian J. Biol. Pest Control.* **25**, 271–288.
 35. Yan M., Roehrl M.H., Wang J.Y. (2007) Discovery of crystalline inclusions in *Bacillus licheniformis* that resemble parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis*. *Can. J. Microbiol.* **53**(9), 1111–1115.
 36. Charles J.F., Nielson-LeRoux C., Delecluse A. (1996) *Bacillus sphaericus* toxins: molecular biology and mode of action. *Annu. Rev. Entomol.* **41**, 451–472.
 37. Park H.-W., Federici B., Sakano Y. (2006) In: *Inclusion Proteins from other Insecticidal Bacteria*. Eds Shively Jessup M., Steinbüchel A. Berlin: Springer, pp. 321–330.
 38. Mizuki E., Park Y.S., Saitoh H., Yamashita S., Akao T., Higuchi K., Ohba M. (2000) Parasporin, a human leukemic cell-recognizing parasporal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **7**(4), 625–634.

Identification of Clinical Isolates of *Bacillus cereus* Group and Their Characterization by Mass Spectrometry and Electron Microscopy

T. A. Smirnova¹, N. B. Polyakov^{1, 2, *}, D. S. Karpov³, A. I. Solovyev¹, N. V. Shevlyagina¹, S. G. Andreevskaya¹, D. N. Shcherbinin¹, Z. S. Plieva¹, V. A. Kozlova¹, A. A. Pereborova¹, I. A. Bogdanov^{1, 4}, D. A. Grumov¹, M. V. Zubasheva¹, S. V. Poddubko⁵, A. A. Grechnikov², M. A. Sukhina⁶, and V. G. Zhukhovitsky^{1, 7}

¹Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Public Health of the Russian Federation, Moscow, 123098 Russia

²Vernadsky Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

³Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

⁴“Nanopromimport” LLC, Moscow State University Science Park, Moscow, 119234 Russia

⁵State Scientific Center of the Russian Federation, Institute of Bio-Medical Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, 123007 Russia

⁶Ryzhikh State Research Center of Coloproctology, Ministry of Health, Moscow, 123423 Russia

⁷Russian Medical Academy of Continuing Professional Education (RMANPO),

Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 125993 Russia

*e-mail: polyakovnb@gmail.com

Bacillus cereus is a spore-forming bacterium found in the environment mainly in soil. *Bacillus* spores are known to be extremely resistant not only to environmental factors, but also to various sanitation regimes. This leads to spore contamination of toxin-producing strains in hospital and food equipment and, there-

fore, poses a great threat to human health. Two clinical isolates identified as *B. cereus* and *B. cytotoxicus* were investigated in the present work. It was shown that their calcium ion content was significantly lower than that of the reference strains. According to electron microscopy, one of the isolates SRCC 19/16 has an enlarged exosporium, and isolate SRCC 1208 shows large electron-dense inclusions of unclear nature during sporulation. We can assume that it contains a biologically active component with a cytotoxic effect and possibly plays a role in pathogenesis. Comparative chemical, biochemical, physiological, and ultrastructural analysis of spores of clinical isolates and reference strains of *B. cereus* was performed. The results obtained deepen our understanding of the properties of spores that contribute to the increased pathogenicity of *B. cereus* group species.

Keywords: *Bacillus cereus*, *Bacillus cytotoxicus*, spore, electron microscopy, mass spectrometry