

УДК: 579.6

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2025.3.84

К ВОПРОСУ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ПАРАСПОРАЛЬНЫХ ТЕЛ И СПОР

Хлопова К.В.¹ – мл. науч. сотр. лаб. микробиологии сибирской язвы (ORCID 0000-0001-7611-3608); Горшков-Кантакузен В.А.^{2*} – врач-бактериолог, ст. преп. каф. медицинской микробиологии им. акад. З.В. Ермольевой (ORCID 0000-0002-4691-4719); Чикина Ю.В.¹ – лаборант-исследователь лаб. микробиологии сибирской язвы (ORCID 0009-0000-3361-543X); Тимофеев В.С.¹ – канд. биол. наук, зам. директора по аналитической работе (ORCID 0000-0002-9501-1380)

¹ ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

² ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования»

*cantacuzene.patent@gmail.com

Ключевые слова: параспоральное тело, окраска, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, кумасси бриллиантовый синий.

Key words: parasporal bodies, staining, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, Coomassie Brilliant Blue

Финансирование: Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Поступила: 25.05.2025

Принята к публикации: 26.08.2025

Опубликована онлайн: 15.09.2025



РЕФЕРАТ

Несмотря на бурное развитие молекулярно-генетических методов исследования, буквально перевернувших наши представления о микроорганизмах, классические для микробиологии методы всё ещё не теряют своей актуальности. Особенно это касается вопросов, когда необходимо установить наличие у бактерии органелл или способности к токсинообразованию. В настоящей статье рассмотрены возможности визуализации параспоральных тел на примере *B. thuringiensis* с помощью окраски кумасси бриллиантовым синим. В работе использовались штаммы *B. thuringiensis* ИПМ-3 (Н-1), ИПМ-4 и ИПМ-4, а также штамм *B. anthracis* Δ Ames (отрицательный контроль). Из единичных колоний культур, выращенных на агаре Хоттингера, готовили мазки как это принято в лабораторной практике, после чего окрашивали смесью, состоящей из 0,133% кумасси бриллиантового синего (G) в 50% растворе уксусной кислоты, и микроскопировали. Исследование мазков показало, что наилучшая визуализация параспоральных тел достигается при использовании двухсуточной культуры, а также экспозиции красителя в течении 30 минут. В этом случае достигается визуализация параспоральных тел в виде тёмно-синих структур на фоне светло-синих клеток и блестящих овальных спор во всех полях зрения. Предложенный способ окраски позволяет относительно просто визуализировать параспоральные тела, а также споры, что

особенно важно при дифференцировке *B. anthracis*. Кроме того, визуализация спор в случае *B. anthracis* позволяет оценить качество споруляции, что делает предложенный способ безопасным конкурентом существующих.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Интересной особенностью некоторых спорообразующих бацилл является формирование «придатков, прикрепленных к концам эндоспор, или спиралевидных структур, окружающих эндоспоры», которые в начале XX века описал Поль Дебезье, назвав «параспоральными телами» [1, 2]. И хотя он смог обнаружить их только в случае бацилл, выделенных из кишечного тракта насекомых, уже к середине века стало понятно, что они формируются у разных представителей рода *Bacillus* [3]. Обнаружение этих органелл опровергло представление о том, что прокариотические клетки имеют простую структуру [4], а также позволило переосмыслить видовую принадлежность внутри такой мономорфной группы, как *Bacillus cereus* complex. В частности, отсутствие параспоральных тел у штаммов, считающихся *B. thuringiensis*, заставляет усомниться в их видовой принадлежности, поскольку именно в них синтезируется инсектицидный Vt-токсин. Это важно, поскольку штаммы *B. thuringiensis* находят широкое применение в сельском хозяйстве [5] и, следовательно, использование «не того» штамма может привести к нежелательным последствиям. Так, использование штамма, ошибочно отнесенного к *B. thuringiensis*, спровоцировало массовые инвазии китайских триониксов (*Tryonux sinensis*) с летальным исходом, происходящие с 2013 года на фермах Китая и Тайваня. Выделенный от них штамм JMT, позднее идентифицированный как *B. tropicus*, был занесён с соседнего поля, где применялся в качестве биопестицида [6, 7]. Таким образом, возможность определения наличия параспорального тела рутинными микробиологическими методами является важным инструментом для идентификации штаммов в сельском хозяйстве. Кроме того, это может быть полезно и в практическом здравоохранении, для дифференцировки спор *B. anthracis*, у которых данная органелла отсутствует.

Важно понимать, что окраска параспоральных тел дело непростое. Ещё С.Р. Датки в 1940 году писал, что «спора и гранула [т.е. параспоральное тело] гомологичны по структуре, и они не впитывают ни красители, ни йод» [8]. Тем не менее, в 2002 году был предложен способ окраски на основе трифенилметанового красителя кумасси бриллиантового синего (Coomassie Brilliant Blue), используемого в текстильной промышленности [9]. Этот краситель также применяется для окраски белков: «R» вариант с 1964 года [10], а «G» вариант в растворе уксусной кислоты в метаноле – с 1967 года [11].

Суть предложенного в 2002 году метода, использованного для идентификации *B. thuringiensis* [7] и *B. tropicus* JMT [9], сводится к приготовлению фиксированного пламенем мазка суточной бактериальной культуры, на который наносится краска (0,133% кумасси бриллиантового синего в 50% растворе уксусной кислоты). Далее мазок промывается дистиллированной водой, высушивается и микроскопируется в 100-кратном увеличении с помощью светового микроскопа под масляным иммерсионным объективом.

Поскольку описание методики крайне скудно (в частности, непонятно, какую форму красителя использовать и какова длительность его экспозиции), а приведённые в публикациях изображения спорны, в настоящей статье мы уточним методику, а также покажем возможности её применения для окраски спор.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

В настоящей работе были использованы штаммы, формирующие при спорообразовании параспоральные тела, а именно *B. thuringiensis*: ИПМ-3 (Н-1), выделенный в Узбекистане, Ташкент; ИПМ-4, выделенный во Франции и переданный из коллекции Institut Pasteur; ИПМ-26 Giensis (insectus) выделенный в России, Красноярск. В качестве отрицательного контроля использовался штамм *B. anthra-*

cis Δ Ames. Все штаммы получены нами из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск».

Штаммы рассеивали до единичных колоний и культивировали при 28°C на плотной питательной среде «агар Хоттингер» (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия). Через 24 и 48 часов из единичных колоний приготавливали мазок, высушивали, фиксировали и окрашивали в течение одной и 30 минут, после чего краситель удаляли дистиллированной водой, а окрашенный мазок высушивали.

Фиксация препаратов с культурами *B. thuringiensis* осуществлялась над пламенем горелки, а с культурой *B. anthracis* Δ Ames – в фиксирующем растворе (смесь 96% раствора этилового спирта и 3% раствора перекиси водорода).

Для окрашивания мазков использовали свежеприготовленный реактив, состоящий из 0,1% Coomassie Brilliant Blue G 250 С.И. 42655 (Serva, USA) в 50% растворе уксусной кислоты.

Исследование окрашенных мазков проводили с использованием иммерсионной системы «Микромед Р-1» (Микромед, Китай) (окуляр – 10 \times , объектив – 100 \times), иммерсионного масла (Альтами, Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Исследование окрашенных мазков из суточной культуры не выявило отличий в окраске, причём одноминутное окрашивание, считающееся наиболее эффективным для бацилл [12], не привело к закреплению красителя, в связи с чем было принято решение осуществлять экспозицию в 30 минут в жидкой камере, а также использовать для приготовления мазков двухсуточную культуру в фазе отмирания или споруляции вегетативных клеток, для которой выше вероятность наличия сформированных параспоральных тел. Исследование окрашенных мазков из этой культуры (для всех исследованных штаммов) позволило во всех полях зрения чётко визуализировать параспоральные тела в виде тёмно-синих структур на фоне светло-синих клеток и блестящих овальных спор. При этом, у контрольного штамма эта структуры отсутствовали, а дозревающие споры располагались по всему периметру цепей, что характерно для сибиреязвенного микроба. Полученные результаты представлены на Рис.1.

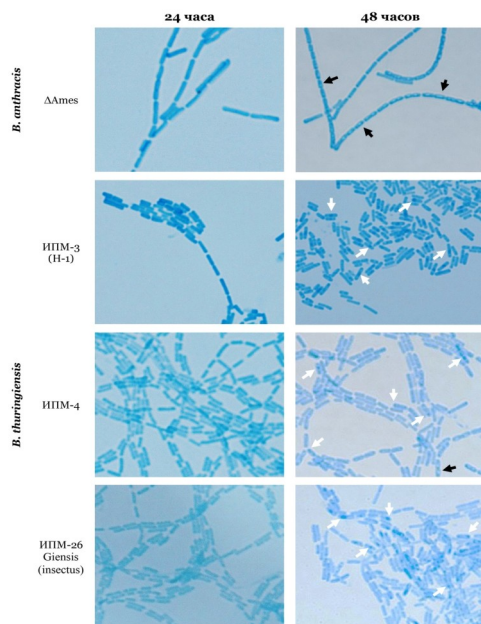


Рисунок 1 – Микропрепараты *B. thuringiensis* ИПМ-3 (H-1), ИПМ-4, ИПМ-26 Gienis (insectus), а также *B. anthracis* Δ Ames (отрицательный контроль) через 24 и 48 часов культивирования. Можно видеть параспоральные тела в виде тёмно-синих структур (белые стрелки) на фоне светло-синих клеток и блестящих овальных спор (чёрные стрелки). окуляр – 10 \times , объектив – 100 \times окраска кумасси бриллиантовым синим (время экспозиции – 30 минут).

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Проведённое нами исследование чётко показывает возможность применения данной методики для визуализации параспоральных тел только в случае использования двухсуточной культуры, выращенной на плотной питательной среде, при полчасовой экспозиции красителя. В этом случае получается чётко визуализировать параспоральные тела во всех полях зрения. Кроме того, окраска позволяет визуализировать споры, что стало для нас открытием, поскольку значительно расширило границы применения способа, сделав возможным определять качество споруляции культур сибиреязвенного микроба. Это особенно важно ввиду того, что в настоящее время в лабораторной практике, согласно МУК 4.2.2413-08, окрашивание спор осуществляют исключительно карболовым функсином по Циллю-Нильсену, однако необходимость использования множества компонентов с разным временем экспозиции делает данный метод окраски трудновоспроизводимым. Кроме того, имеются значительные сложности в интерпретации результатов окрашивания, поскольку отличать бактериальные споры от всевозможных артефактов бывает весьма затруднительно: споры, в зависимости от степени их жизнеспособности, могут визуализироваться розовыми с более интенсивной окраской по периферии (жизнеспособные), красными (слабо жизнеспособные) либо синими (не жизнеспособные).

Справедливости ради надо сказать, что в качестве альтернативы окраски карболовым функсином по Циллю-Нильсену предлагается микроскопия чистой сибиреязвенной культуры методами раздавленной или висячей капли [13]. Однако эти методы не безопасны с точки зрения риска вероятности аварийных ситуаций и, потенциально, аварий с возбудителем особо опасной инфекции, и поэтому не подходят для работы с активным материалом. Все остальные существующие классические методы подразумевают использование прогревания (кипячения) препарата с красителем или использования ки-

пящих растворов (1% HCl, 1% HNO₃ или 0.5% H₂SO₄), что в свою очередь уже увеличивает не только риск аварии, но и возможность получения специалистом химических ожогов. В этом смысле предлагаемый нами способ выигрывает своей простотой исполнения и интерпретации.

TO THE QUESTION OF VISUALIZATION OF PARASPORAL BODIES AND SPORES

Khlopova K.V.¹ – Junior Researcher of the Laboratory of Anthrax microbiology (ORCID: 0000-0001-7611-3608); **Gorshkov-Cantacuzene V.A.**^{2*} – bacteriologist, Senior Lecturer of the Yermolyeva Department of medical microbiology (ORCID: 0000-0002-4691-4719); **Chikina Yu.V.**¹ – Laboratory Researcher of the Laboratory of Anthrax microbiology (ORCID: 0009-0000-3361-543X); **Timofeev V.S.**¹ – PhD in Biology, Deputy Director for Analytical Work (ORCID: 0000-0002-9501-1380)

¹State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for the Oversight of Consumer Protection and Welfare

²Russian Medical Academy of Continuous Professional Education of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation

*cantacuzene.patent@gmail.com

Financing: The work was carried out within the framework of the Rospotrebnadzor industry program.

ABSTRACT

Despite the rapid development of molecular genetic methods of research, which have literally overturned our understanding of microorganisms, the classical methods of microbiology still do not lose their relevance. Especially it concerns questions when it is necessary to establish the presence of organelles or toxin-forming ability in a bacterium. In the present article the possibilities of visualisation of parasporal bodies on the example of *B. thuringiensis* by means of Cumassi Brilliant Blue staining are considered. *B. thuringiensis* strains IPM-3 (H-1), IPM-4 and IPM-4, as well as *B. anthracis* Δ

Ames strain (negative control) were used in this work. From single colonies of cultures grown on Hottinger's agar, smears were prepared as is customary in laboratory practice, then stained with a mixture consisting of 0.133% Cumassi Brilliant Blue (G) in 50% acetic acid solution and microscopied. Examination of smears showed that the best visualisation of parasporal bodies is achieved when a two-day culture is used, and dye exposure for 30 minutes. In this case visualisation of parasporal bodies in the form of dark-blue structures on the background of light-blue cells and shiny oval spores in all fields of view is achieved. The proposed staining method allows for relatively simple visualization of parasporal bodies and spores, which is especially important when differentiating *B. anthracis* from other representatives of the *Bacillus cereus* complex. In addition, visualization of spores in the case of *B. anthracis* allows for evaluation of the quality of sporulation, making the proposed method a safe competitor to existing ones.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Debaisieux P. Organsmes bacilliformes à structure parasporale spiralée. Ann Soc Sci Bruxe. 1926;45:94-96.
2. Debaisieux P. Structures parasporales chez les bactéries. Ann Soc Sci Bruxe. 1927;47:89-90.
3. Bartholomew J.W., Clare P. Parasporal bodies of *Bacillus* spores. J Bacteriol. 1956;71(2):158-161. <https://doi.org/10.1128/jb.71.2.158-161.1956>.
4. Greening C., Lithgow T. Formation and function of bacterial organelles. Nat Rev Microbiol. 2021;18:677-689. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0413-0>.
5. Ереги́на С.В., Кузнецова М.М. Потенциал исследования микроорганизмов рода *Bacillus* в растениеводстве. Известия Санкт-Петербургского государственного аграрного университета. 2024; 3(77):19-35. <https://doi.org/10.24411/2078-1318-2024-3-19-35>.
6. Chen J., Zhu N., Kong L. et al. First reported fatal *Bacillus thuringiensis* infections in Chinese softshelled turtles (*Trionyx sinensis*). Aquaculture. 2014;428-429:16-20. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.02.018>
7. Tsai J.-M., Kuo H.-W., Cheng W. Retrospective Screening of Anthrax-like Disease Induced by *Bacillus tropicus* str. JMT from Chinese Soft-Shell Turtles in Taiwan. Pathogens. 2023;12(5):693. <https://doi.org/10.3390/pathogens12050693>.
8. Dutky S.R. Two new spore-forming bacteria causing milky diseases of Japanese beetle larvae. J Agr Research. 1940;61:57-68.
9. Rampersad J., Khan A., Ammons D. Usefulness of staining parasporal bodies when screening for *Bacillus thuringiensis*. Journal of Invertebrate Pathology. 2002;79(3):203-204. [https://doi.org/10.1016/s0022-2011\(02\)00018-6](https://doi.org/10.1016/s0022-2011(02)00018-6).
10. De St. Groth S.F., Webster R.G., Datyner A. Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. Biochimica et Biophysica Acta. 1963;71:377-391.
11. Altschul A.M., Evans W.J. Zone electrophoresis with polyacrylamide gel. Methods in Enzymology. 1967;11:179-186.
12. Биргер О.Г., Богомолец А.А. Коршун С.В., и др. Основы медицинской микробиологии. Том I. Москва-Ленинград: Государственное издательство. 1930. 689 с.
13. Маринин Л.И., Дятлов И.А., Мокриевич А.Н., и др. Методы изучения биологических и молекулярно-генетических свойств возбудителя сибирской язвы (Учебно-методическое пособие). Оболенск: Династия. 2021. 239 с.

REFERENCES

1. Debaisieux P. Organsmes bacilliformes à structure parasporale spiralée. Ann Soc Sci Bruxe. 1926;45:94-96.
2. Debaisieux P. Structures parasporales chez les bacteria. Ann Soc Sci Bruxe. 1927;47:89-90.
3. Bartholomew J.W., Clare P. Parasporal bodies of *Bacillus* spores. J Bacteriol. 1956;71(2):158-161. <https://doi.org/10.1128/jb.71.2.158-161.1956>.
4. Greening C., Lithgow T. Formation and function of bacterial organelles. Nat Rev Microbiol. 2021;18:677-689. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0413-0>.

5. Eregina S.V., Kuznetsova M.M. Potential for studying microorganisms of the genus *Bacillus* in plant growing. Bulletin of the St. Petersburg State Agrarian University. 2024; 3(77):19-35. <https://doi.org/10.24411/2078-1318-2024-3-19-35>.
6. Chen J., Zhu N., Kong L. et al. First reported fatal *Bacillus thuringiensis* infections in Chinese softshelled turtles (*Trionyx sinensis*). Aquaculture. 2014;428-429:16-20. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.02.018>
7. Tsai J.-M., Kuo H.-W., Cheng W. Retrospective Screening of Anthrax-like Disease Induced by *Bacillus tropicus* str. JMT from Chinese Soft-Shell Turtles in Taiwan. Pathogens. 2023;12(5):693. <https://doi.org/10.3390/pathogens12050693>.
8. Dutky S.R. Two new spore-forming bacteria causing milky diseases of Japanese beetle larvae. J Agr Research. 1940;61:57-68.
9. Rampersad J., Khan A., Ammons D. Usefulness of staining parasporal bodies when screening for *Bacillus thuringiensis*. Journal of Invertebrate Pathology. 2002;79(3):203-204. [https://doi.org/10.1016/s0022-2011\(02\)00018-6](https://doi.org/10.1016/s0022-2011(02)00018-6).
10. De St. Groth S.F., Webster R.G., Datyner A. Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. Biochimica et Biophysica Acta. 1963;71:377-391.
11. Altschul A.M., Evans W.J. Zone electrophoresis with polyacrylamide gel. Methods in Enzymology. 1967;11:179-186.
12. Birger O.G., Bogomolets A.A. Korshun S.V., et al. Fundamentals of Medical Microbiology. Volume I. Moscow-Leningrad: State Publishing House. 1930. 689 p.
13. Marinin L.I., Dyatlov I.A., Mokrievich A.N., et al. Methods for studying the biological and molecular genetic properties of the anthrax pathogen (Tutorial). Obolensk: Dynasty. 2021. 239 p.