

## ОСОБЛИВОСТІ ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОЦЕСІВ СПОРУЛЯЦІЇ ТА ГЕРМІНАЦІЇ У ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ *BACILLUS*

Книш О. В., Мартинов А. В.

Інститут мікробіології та імунології  
ім. І. І. Мечникова

**Введення.** Життєвий цикл бактерій роду *Bacillus* складається з двох фаз: метаболічно активної вегетативної клітини та метаболічно сплячої структури - спори. Вегетативні клітини бацил паличкоподібні, прямі або злегка зігнуті, розташовуються поодинокі, парами, ланцюжками, а іноді у вигляді довгих ниток і мають грампозитивний тип клітинної стінки. Найважливішою ознакою належності до роду *Bacillus* є здатність до утворення ендоспор за аеробних умов [1]. Процес спорування розглядають як своєрідну стратегію виживання в несприятливих умовах навколишнього середовища. Зазвичай спорування індують знижений рівень доступних поживних речовин та суворі стресові умови. Завдяки особливостям структури, хімічного складу та існуванню безлічі механізмів резистентності спори можуть виживати протягом багатьох років, навіть століть, витримуючи вплив ультрафіолетового випромінювання, шкідливих хімічних, термічних та інших чинників, які вбивають вегетативні клітини. Зріла спора є найвитривалішим біологічним організмом, відомим на даний момент [2, 3].

**Стадії спорування.** Розуміння процесу утворення ендоспор почалося завдяки розвитку методів оптичної мікроскопії та фарбування [4]. Поява електронної мікроскопії дозволила розробити більш повну цитологічну модель спорування. У 1965 році Antoinette Ryter на основі своїх власних досліджень спор *B. subtilis* та досліджень Young & Fitz-James спор *B. cereus* визначила шість стадій спорування [5]. Пізніше, з урахуванням даних флуоресцентної мікроскопії та методів генетичного аналізу, ця класифікація була розширена до восьми стадій (рис. 1) [4, 6, 7].

Під час спорування вегетативна клітина відмовляється від нормального клітинного поділу. Замість цього у внутрішньоклітинному компартменті формується ендоспора, яка після дозрівання і лізису материнської клітини вивільняється в оточуюче середовище. Спорують під контролем генетичних сигма ( $\sigma$ ) факторів, які суттєво змінюють клітину на транскрипційному та фізіологічному рівнях [2, 4].

**Структура спор.** Споры мають відмінну від вегетативних клітин структуру та низку властивих лише їм особливостей і складових. Починаючи ззовні і продовжуючи всередину, в структурі спори спостерігаються такі шари: **екзоспорій**, утворений глікопротеїнами і зустрічається на спорах не всіх видів бацил; **спорова оболонка**, яка забезпечує стійкість до деяких хімічних речовин та екзогенних літичних

ферментів; **зовнішня мембрана**, за якою йде **кора**, що складається з пептидоглікану з кількома специфічними для спор модифікаціями; **гермінативна клітинна стінка**, яка також складається з пептидоглікану зі структурою, ідентичною структурі пептидоглікану вегетативної клітини; **внутрішня мембрана** і **центральне ядро** (рис. 2). Ядро містить більшість спорних ферментів, нуклеїнові кислоти: ДНК та РНК, невеликі кислоторозчинні білки, пов'язані з ДНК, рибосоми та DPA (дипіколінова кислота, переважно в хелатній формі з двовалентними катіонами, головним чином з  $\text{Ca}^{2+}$ , тобто Ca-DPA) [3, 8].

**Електронна мікроскопія** зіграла вирішальну роль у вивченні структури спор та з'ясуванні послідовності етапів спорування. Усі вісім етапів можна легко розрізнити на тонких зрізах за допомогою електронної мікроскопії. Однак цей метод не дозволяє легко здійснювати кількісний моніторинг ходу або визначати ступінь синхронності процесу спорування. Для цього більш придатні методи **світлової мікроскопії**. Завдяки своїй щільності та значно вищому, ніж у вегетативних клітин, показнику заломлення спори добре виявляються за допомогою **фазово-контрастної мікроскопії** у нативних нефіксованих препаратах. Проте за допомогою фазово-контрастної мікроскопії не можна побачити спори на ранніх стадіях (від I до III). Стадія спорування IV (передспора) виглядає як фазово-темна клітина, що містить ще темніше тіло. Стадія V виглядає як фазово-темна клітина, яка містить частково або повністю заломлюючу спору, діаметр якої у представників роду *Bacillus* не перевищує діаметру мікробної клітини. При застосуванні фазово-контрастної мікроскопії неможливо також відрізнити стадію VI (дозрівання) від стадії V (зрілої ендоспори). Стадію VII (вільну спору) упізнати, звичайно, легко. Для спостереження за споруванням більш придатним є метод **інтерференційно-контрастної мікроскопії** Номарського. Він дозволяє швидко і легко розрізнити стадії спорування: септацію (стадія II), поглинання (стадія III), фазу темної передспори (відповідає утворенню кори, стадія IV), фазу яскравої спори в спорангії (відповідає утворенню оболонки, стадія V), і вільну спору (стадія VII). Таким чином, лише стадія I (осьова нитка) і стадія VI (дозрівання рефракційної спори) потребують електронної мікроскопії для виявлення [9].

### Додаткова перевірка життєздатності спор.

Спори, що пережили потужний стрес, можуть мати вигляд мертвих. Але при цьому може бути інактивованим лише деякий компонент апарату для проростання і спори все ще можуть бути життєздатними, якщо їх проростити штучно. Тому важливо встановити, що оброблені спори дійсно мертві, а не просто в стані «глибокого сну» або не здатні проростати за звичайних умов. Для цього потрібний не лише посів на багаті середовища, а й відновлення шляхом пророщування екзогенним лізоцимом [3].

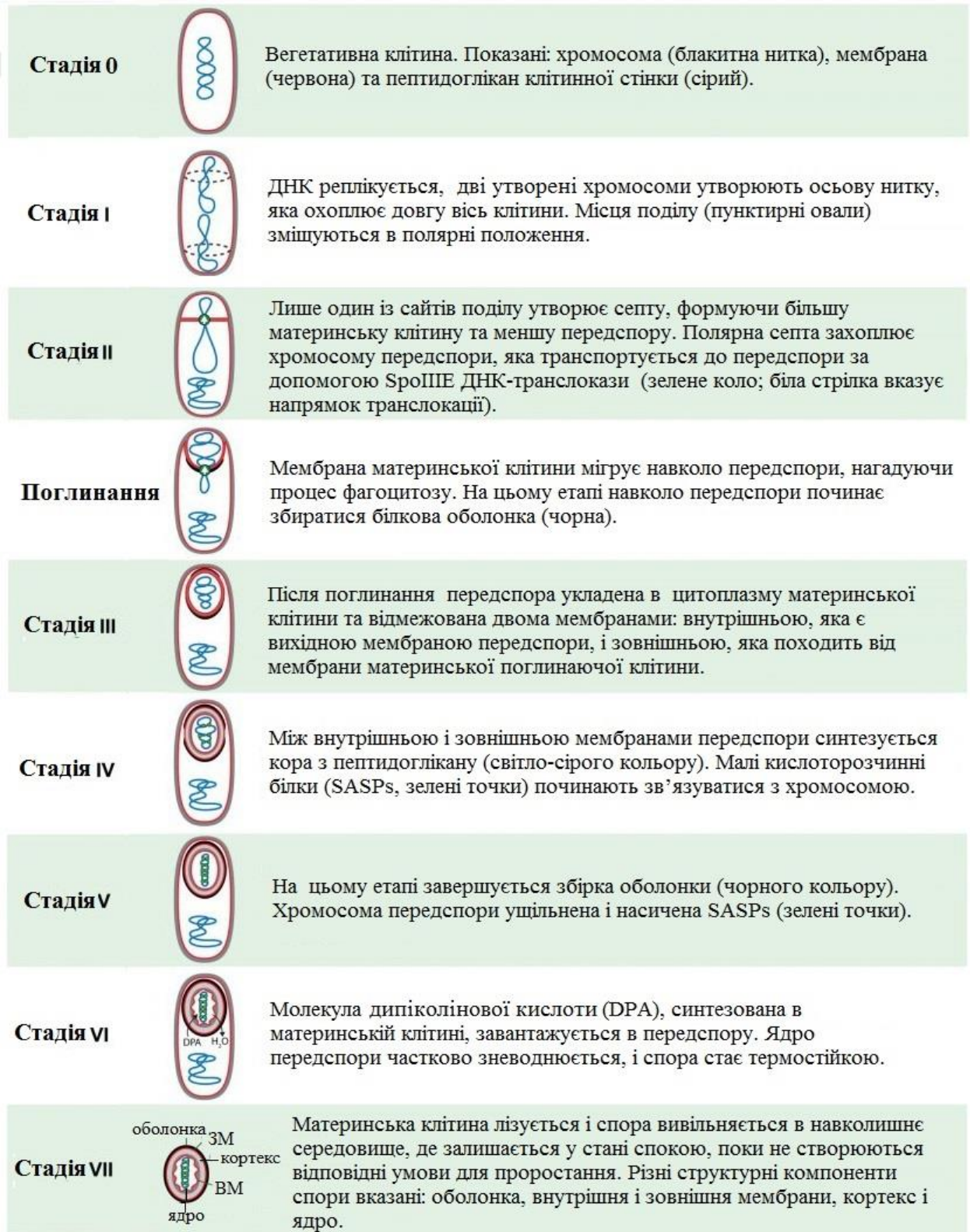


Рис. 1. Стадії споруляції за А. Ryter [4].

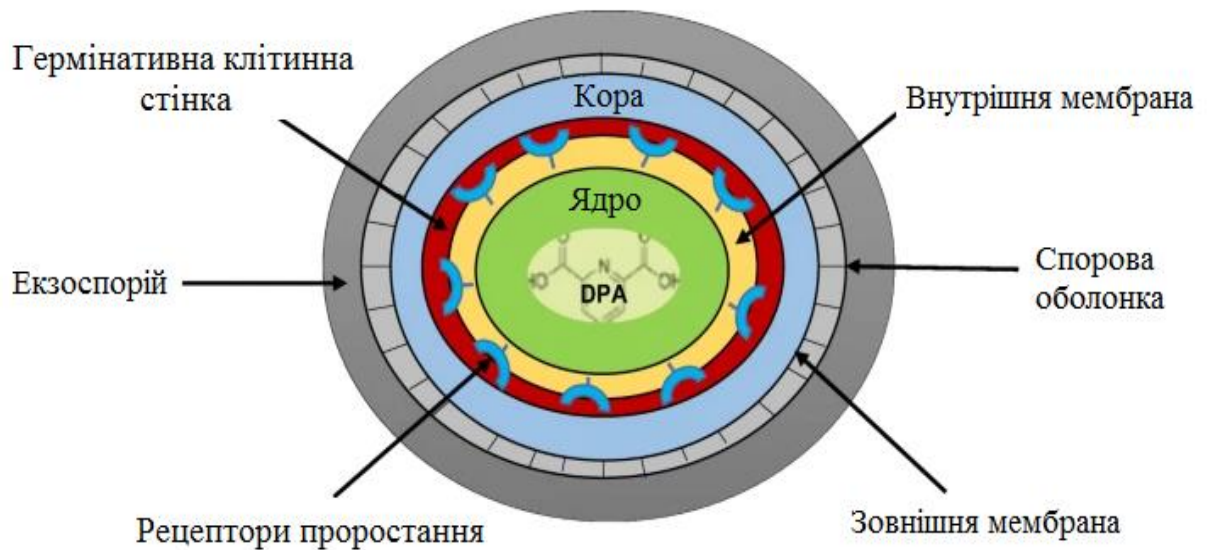


Рис. 2. Схематичне зображення структури спори [8].

**Забарвлення спор** забезпечує дослідника дуже цінною та корисною інформацією, оскільки їх присутність, форма (кругла або овальна), розташування всередині вегетативної клітини (центральне, парацентральне, субтермінальне або термінальне) та здатність або нездатність її деформувати - це дані, якими можна керуватися при ідентифікації спорових бактерій [1, 10]. Методи виготовлення забарвлених препаратів є економічними, швидкими та надійними інструментами для інтерпретації, архівування та постановки важливих діагнозів, яких неможливо було б досягти будь-яким іншим способом [11].

Товста стінка та хімічний склад спор запобігає проникненню в них більшості барвників. Тому звичайне забарвлення аніліновими барвниками не дозволяє візуалізувати спори, вони залишаються безбарвними. Для їх виявлення існують спеціальні методи фарбування. Вони засновані на застосуванні високих температур та протрав, що забезпечують розпушування міцних оболонок спор та полегшують проникнення барвника в їх товсту структуру. Після того, як спора забарвиться, барвник вже не може видалитися з неї.

У 1930 році мікробіологи *Еліс Шеффер* і *Макдональд Фултон* для виявлення ендоспор запропонували використовувати малахітовий зелений і сафранін (*Shaeffer-Fulton method*) [10, 11, 12, 13, 14]. Цей метод забарвлення найбільш широко застосовується у лабораторіях. Іноді його називають на честь двох бактеріологів 1900-х років – *Віртца* і *Конкліна* (*Wirtz-Conklin modified spore stain*) [15, 16]. Він передбачає три-чотириразове підігрівання фіксованого препарату над полум'ям пальника до появи парів або прогрівання над ванночкою з окропом впродовж 5-6 хвилин у 5% водному розчині малахітового зеленого, охолодження, промивання водою та фарбування препарату розведеним водним

розчином сафраніну-О (0,5% - впродовж 30 секунд або 0,1% - впродовж 3 хвилин). Малахітовий зелений потрапляє у вегетативні клітини, а при підігріванні проникає в ендоспору. При промиванні водою барвник видаляється з вегетативної клітини, бо слабо зв'язується з її структурами. Натомість він не може видалитися зі спор. Знебарвлена вегетативна клітина забарвлюється сафраніном. Цей механізм забарвлення справедливий для інших принципово подібних методів. Вони відрізняються між собою барвниками, способами забезпечення проникнення барвників у спори та знебарвлення вегетативних клітин.

Метод забарвлення Віртца-Конкліна вигідно вирізняється з-поміж інших тим, що дозволяє диференціювати спори на стадіях спокою та проростання [16]. Спори на стадії спокою набувають зеленого забарвлення, а вегетативні тіла бактерій та спори на стадії проростання – рожевого. Застосування цього методу забарвлення виявляє початок проростання спор вже через 30 хвилин після їх інкубації в середовищі проростання.

**Метод Дорнера (Dorner's method)** передбачає фарбування висушеного і фіксованого препарату карболовим фуксином. На препарат накладають підігнаний за розміром скла фільтрувальний папір, насичують його барвником і випарюють над полум'ям пальника або над ванночкою з окропом впродовж 5-10 хвилин. Після видалення фільтрувального паперу препарат знебарвлюють сумішшю кислоти та спирту протягом 1 хвилини. Промивають водопровідною водою і підсушують. На предметне скло наносять тонкий шар насиченого водного розчину нігрозину, висушують. Вегетативні клітини виглядають майже безбарвними на темно-сірому тлі, спори забарвлені у червоний колір. Менш трудомістким є модифікований метод Дорнера: суспензію спорових бактерій змішують у пробірці з рівним об'ємом карболового фуксину. Пробірки опускають на 10 хвилин у водяну баню з окропом. На предметному склі змішують

краплю суспензії бактерій, яка зазнала нагрівання, з краплею 7 % водного нігрозину. Виготовлений тонкий мазок підсушують на повітрі [10].

**Метод Меллера (Moeller's method)** передбачає обробку препарату хлороформом та хромовою кислотою перед фарбуванням карболовим фуксином з прогріванням, використання підкисленого етанолу для знебарвлення та контрастне забарвлення метиленовим синім. Спори виглядають червоними, а вегетативні бактерії - синіми. У 2007 році Hayama M. зі співавторами модифікували метод Меллера. Вони усунули етап нагрівання барвника, замінили його додаванням двох крапель поверхнево-активної речовини Тергітолу 7 на кожні 10 мл розчину карболового фуксину і отримали ті самі результати [17].

Фарбування за **методом Ожешки (Anjesky technique)** відрізняється використанням розчину сірчаної (або соляної кислоти) як протрави. Мазок фарбують карболовим фуксином. Ціля під час нагрівання протягом 3-5 хв. Знебарвлюють розчином сірчаної кислоти, промивають водою і дофарбовують 3-5 хвилин метиленовим синім. Цитоплазма вегетативних клітин матиме синій колір, а спори – червоний [18].

**Метод Пешкова (Peshkov's method)** полягає у фіксуванні висушеного препарату із культури бацил у рідині Карнуа протягом 15 хвилин, промиванні водою, фарбуванні лужним метиленовим синім за Леффлером із нагріванням до появи парів, не більше 15-20 секунд, промиванні водою і дофарбовуванні 0,5 % водним розчином нейтрального червоного або фуксином Пфейфера 30-60 секунд. В результаті зрілі ендоспори забарвлюються у блакитний колір, молоді – у темно-синій, цитоплазма вегетативних клітин – у червоний, зерна хроматину - у фіолетовий колір [19].

Спори можуть залишатися в сплячій формі протягом тривалого часу. При цьому вони зберігають чутливість до появи в оточуючому середовищі специфічних сигналів порушення спокою - гермінантів. Проростання починається з активації метаболічної діяльності, що супроводжується утворенням АТФ, синтезом РНК і білків. Згодом відбувається реплікація ДНК, що призводить до росту вегетативних клітин [8].

**Дослідження процесу гермінації.** Процес проростання спор можна виявити та кількісно оцінити. Для цього можуть бути використані різні методи, засновані на виявленні фізичних, біологічних та хімічних ознак цього процесу (рис. 3).

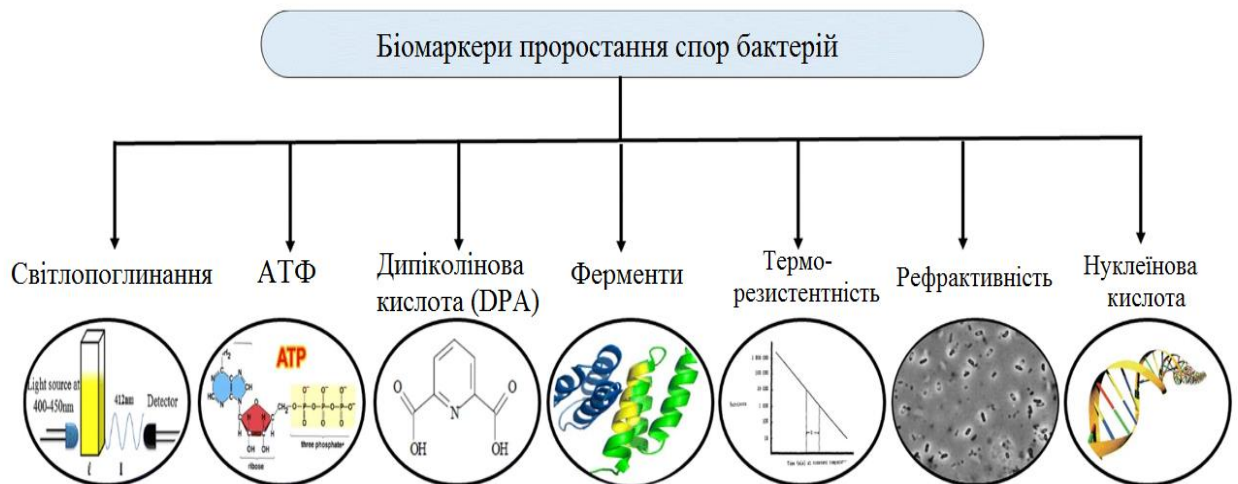


Рис. 3. Біомаркери проростання спор бактерій [8].

Проростання супроводжується змінами рефрактивних властивостей спор – втратою їх здатності сильно заломлювати світло. Перехід від фази світлих сплячих спор до фази темних проростаючих спор можна спостерігати візуально, застосовуючи **фазово-контрастну мікроскопію** [8, 20, 21]. Зміни рефрактивних властивостей зумовлені збільшенням пористості білкової оболонки, вивільненням з ядра Са-DPA та гідратацією спор. Проростання спор супроводжується також поступовим збільшенням їх розмірів. Фазово-контрастна мікроскопія дозволяє вивчати гермінацію як на рівні однієї спори, так і на рівні спорової популяції. Pandey R. зі співавторами для аналізу мікроскопічних зображень використали програму Spore Tracker. Вона допомогла

автоматизувати обробку даних від проростання до подвоєння вегетативних клітин [22]. Іноді ліпідні включення можуть бути помилково віднесені до спор, але фазовий перехід, характерний для проростаючих спор, при цьому не спостерігається.

Простим способом дослідження процесу проростання спор є **вимірювання оптичної густини спорової суспензії** (або світлопоглинання) в діапазоні довжин хвиль від 400 до 1000 нм. Зазвичай вимірювання проводять при 600 нм (OD600) в динаміці. Зміни світлопоглинання спорової суспензії є відображенням зменшення показника заломлення спор внаслідок гідролізу кори, вивільнення Са-DPA та гідратації ядра, а також поступового збільшення їх розмірів. OD600 визначають в перші кілька хвилин початкової фази проростання спор, а потім через кожні

10 хв, щоб зафіксувати типові зміни оптичних властивостей суспензії під час проростання. Вимірювання світлопропускання спорової суспензії в динаміці після активації, викликаной тепловим шоком, дозволяє кількісно оцінити процес проростання спор і визначити відсоток схожості. Встановлено, що зниження показника OD600 спорової суспензії при 625 нм на 60 % від початкового значення для інтактних спор відповідає 100 % схожості [8, 16, 20]. Кінетичний аналіз падіння оптичної густини спорової суспензії дозволяє порівняти швидкості проростання однієї спорової популяції за різних умов та різних споривих популяцій за однакових умов. Але OD600 є хорошим біомаркером для спостереження за гермінацією у популяціях, які демонструють відносно хорошу реакцію на проростання. У популяціях з низькою схожістю вимірювання OD600 можуть навіть не показати реакцію. Також важко виявити відмінності між популяціями, коли схожість перевищує 90 %. При порівнянні різних штамів відповідь має відрізнитися щонайменше на 10–20 %, щоб цей метод спостереження був ефективним. Необхідно враховувати той факт, що у популяції спори різні і по-різному реагують на гермінанти, тому зміни оптичної густини суспензії відображають тенденцію до проростання популяції в цілому. Крім того, спори можуть утворювати агрегати або адгезувати до поверхонь у контейнері для тестування, де вимірюється OD600, що утруднює облік та інтерпретацію результатів. Недоліки цього методу, можливі ускладнення вимірювання та інтерпретації отриманих даних потребують паралельного застосування іншого методу дослідження, наприклад, фазово-контрастної мікроскопії або вивільнення DPA [8].

Зручним способом детекції раннього сигналу проростання спор, який дозволяє уникнути недоліків, притаманних методу вимірювання змін оптичної густини, є **визначення активності маркерних ферментів** [8, 23, 24, 25]. Рецептор-опосередкована взаємодія індукторів гермінації зі спорою запускає низку складних біохімічних процесів, зокрема активацію декількох внутрішньоклітинних протеаз та позаклітинних гідролаз, які сприяють диференціації клітин у вегетативну форму. Вимірювання активності ферменту естерази успішно застосоване при дослідженні процесу проростання кількох видів бацил. Метод передбачає використання флуорогенного субстрату, діацетилфлуоресцеїну (DAF), який знаходиться в нефлуоресцентному стані і є ацетильованим похідним зеленого флуоресцентного барвника флуоресцеїну. Після того, як спора проростає, DAF гідролізується естеразами, ліпазами і протеазами та перетворюється в деацетильовану форму - високофлуоресцентну сполуку флуоресцеїн та побічні продукти (оцтову кислоту/ацетальдегід). Висновок про експресію естерази як ранню подію проростання спор підтверджений вимірюванням рефракційності за допомогою фазово-контрастної мікроскопії [24, 25]. Для аналізу активності ферментів, що вивільняються з початком проростання спор, як

субстрат використаний також хлорид 2,3,5-трифенілтетразолію (Tzm), безбарвна форма якого в процесі ферментативного відновлення перетворюється у похідне формазану червоного кольору [23].

Важливим біохімічним маркером проростання спор є **виділення DPA (дипіколінової або піридин-2,6-дикарбонної кислоти)** [3, 8, 26]. DPA є основним чинником стійкості спор до ультрафіолетового випромінювання, високої температури та захисту ДНК спор від пошкодження [27, 28]. Ця молекула становить 5-15 % сухої маси спор, розташована лише в ядрі, де хелатована двовалентними катіонами, переважно  $\text{Ca}^{2+}$ . DPA синтезується в компартменті материнської споруючої клітини, поглинається передспорою і згодом виділяється в перші хвилини проростання спор. Колориметричний метод, заснований на кількісному визначенні утвореного забарвленого комплексу DPA з іонами  $\text{Fe}^{2+}$  з поглинанням при 440 нм, є достатньо простим, але недостатньо чутливим [29, 30]. Аналітичні методи з використанням металів лантанодів ( $\text{Tb}^{3+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$ ) є ефективними для виявлення низьких концентрацій DPA. Хелати  $\text{Tb}^{3+}$ -DPA,  $\text{Eu}^{3+}$ -DPA та  $\text{Gd}^{3+}$ -DPA мають специфічні довжини хвиль збудження та випромінювання флуоресценції. Вивільнену DPA вимірюють після прямого хелатування до  $\text{Tb}^{3+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$  або  $\text{Gd}^{3+}$  із застосуванням різних методів детекції та їх комбінацій: метало-хелатної хроматографії (ВЕРХ-флуоресценції), спектроскопії, флуориметрії, радіометрії [26, 31, 32, 33, 34]. Заслугове на увагу метод аналізу витіснення барвників з використанням подвійної колориметрично-люмінесцентної сенсорної системи. Він передбачає використання бінарних сумішей видимих або флуоресцентних барвників і катіонів лантанодів. Зокрема, DPA, маючи високу спорідненість до  $\text{Tb}^{3+}$ , витісняє зв'язаний з ним барвник PV (пірокатехоловий фіолетовий) і викликає дві одночасні оптичні реакції: помітну зміну кольору PV від синього до жовтого та селективне випромінювання люмінесценції від  $\text{Tb}^{3+}$ /DPA [30].

Вимірювання рівнів Ca-DPA при проростанні окремих спор у популяціях різноманітних видів і штамів *Bacillus* було проведено за допомогою мікрорідких раманівських пінцетів. При цьому одна спора затримується сфокусованим лазерним променем, а вміст Ca-DPA визначається кількісно за допомогою раманівської спектроскопії. В такий спосіб було визначено концентрацію Ca-DPA у ядрі спори. Вона становить >800 мМ, що значно перевищує розчинність Ca-DPA. Також виявлено, що рівні Ca-DPA відрізняються між окремими спорами в популяції і залежать від їх розмірів [35].

Ще один метод, який може бути використаний для вивчення кінетики проростання в популяції - **визначення втрати спорами термостійкості** [8, 36]. За даними Luu S. та Setlow P., втрата термостійкості навіть передуює вивільненню Ca-DPA та пов'язана зі зміною проникності внутрішньої мембрани спор. Імовірно, ця змінена мембрана не може утримувати DPA під час термічної або кислотної обробки, внаслідок чого спори без DPA швидко гинуть

[36]. Для визначення ступеня проростання зразки спор, підданих впливу поживних або непоживних гермінантів протягом різних періодів часу, інкубують при 65 °C протягом 30 хв. Потім зразки швидко охолоджують на льоду, здійснюють посіви розведених суспензій спор на чашки з триптиказо-соевим агаром для визначення показників життєздатності. Відсоток виживання визначають шляхом порівняння кількості колоній в зразках, підданих впливу гермінантів, зі зразком, що не піддавався їхньому впливу.

Сплячі неушкоджені спори та спори, що втратили зовнішню мембрану або більшу частину своєї оболонки, завдяки особливостям структури демонструють непроникність або погану проникність для барвників нуклеїнових кислот. При проростанні та перетворенні на вегетативні клітини відновлюється можливість **зв'язування нуклеїнових кислот зі специфічними барвниками**. Здавалося б, що застосування таких барвників може швидко і легко виявити процес проростання спор. Однак встановлено, що забарвлення нуклеїнових кислот специфічними барвниками не є ранньою ознакою проростання і відбувається після втрати більшості спор термостійкості, вивільнення Ca-DPA, деградації ДНК-зв'язуючих білків та спорової кори [37, 38]. Застосування проточної цитометрії показало, що серед низки барвників: Syto 9, Syto 11, Syto 12, Syto 13, Syto 14, Syto 15 і Syto 16, найбільш чіткі відмінності флуоресценції між сплячими та пророслими спорами дає барвник Syto 16 [37]. При вивченні процесу проростання спор *B. anthracis* за впливу двох різних комбінацій поживних гермінантів встановлено значний рівень кореляції між підвищенням рівня флуоресценції спор, забарвлених Syto 9, збільшенням відсотка темних спор і зниженням їх термостійкості [39].

Застосування інших двох барвників, що зв'язують нуклеїнові кислоти, - DAPI (4',6-діамідіно-2-феніліндол) та акридинового оранжевого допомогло дослідникам з'ясувати та виявити відмінності між механізмами спороцидної активності етанолу, сильної кислоти та луку. Обробка етанолом і кислотою мала результатом флуоресценцію ядра спори та втрату здатності до проростання. Отримані результати свідчили, що знищення спор зазначеними агентами пов'язане з порушенням бар'єрної функції спорової кори. Спори, оброблені лугом (NaOH), продемонстрували периферичне забарвлення, подібне до забарвлення необроблених сплячих спор. Здатність до проростання таких спор відновлювалася після обробки лізоцимом, що підтверджувало зв'язок пошкодження спор з інактивацією кортекс-літичних ферментів [40].

Акридиновий оранжевий (АО) – флуоресцентний барвник, який зазвичай використовують для диференціації високомолекулярних ДНК (флуоресціює зеленим) та низькомолекулярних РНК (флуоресціює червоним). За даними деяких авторів, забарвлення АО – простий і ефективний спосіб диференціації життєздатних і нежиттєздатних бактеріальних спор, а також

дискримінації спор від вегетативних клітин [41, 42, 43]. Нежиттєздатні спори флуоресціюють лимонно-зеленим, а життєздатні - оранжево-червоним [41]. Аналіз кольорового флуоресцентного зображення проростаючих спор *B. subtilis var. niger* дозволив виявити клітинну популяцію, в якій спочатку переважали невеликі зелені спори, а потім, у відповідь на стимуляцію D-глюкозою, з'явилися щонайменше три додаткові помітні субпопуляції: 1) невеликі круглі або довгасті червоні клітини; 2) проміжні та великі метакроматичні клітини; 3) великі червоні палички. Зрідка зустрічалися великі зелені палички. Червоне забарвлення – ознака метаболічного відновлення після спокою, або синтезу РНК, пов'язаного із проростанням. Для відносного вимірювання червоних, зелених і синіх сигналів та для кореляції розміру різних субпопуляцій з їх кольоровими випромінюваннями флуоресценції в часі використали комп'ютерний аналіз цифрових зображень. Аналіз зображень продемонстрував тенденцію до збільшення розміру та червоної емісії в процесі проростання спор. Середня червона емісія виявилася хорошим дискримінатором для різних субпопуляцій [42]. Однак, незважаючи на переконливі дані мікроскопічних спостережень, чіткі піки спектрального випромінювання > 590 нм при спектрофлуориметрії не спостерігаються. Цей парадокс мікроскопії та спектрофлуориметрії задокументовано в роботі Bruno J. G. Автором висунуті гіпотези, які пояснюють дуже слабкі спектральні зміни в червоній області, що не корелюють з рясною оранжево-червоною флуоресценцією молодих вегетативних клітин при люмінесцентній мікроскопії [44].

Для виявлення проростання спор був також застосований **метод біоломінесценції АТФ** на основі реакції люциферин/люцифераза [8, 45]. Кількість АТФ у сплячих спорах дуже низька (менше 1 % пулу аденінових нуклеотидів). Проростання супроводжується збільшенням вмісту цієї молекули до 80 %. Принцип роботи біоломінесцентного аналізу заснований на окисненні люциферину в присутності АТФ люциферазою з одночасним утворенням фермент-зв'язаного комплексу люциферил-аденілат. Комплекс окислюється до оксилуциферину, який переходить із збудженого в стаціонарний стан, випромінюючи світло через швидку втрату енергії. У цій реакції випромінюються фотони з квантовим виходом близько 90 %. Переваги біоломінесцентного методу – висока чутливість та швидкість. Однак метод не придатний за наявності у середовищі речовин, здатних впливати на активність люциферази [8].

**Поєднання кількох методів** дозволяє більш різносторонньо і ґрунтовно охарактеризувати процес проростання спор. Описаний досвід застосування протоколу дослідження гермінації, що поєднує диференційно-інтерференційну (DIC), фазово-контрастну, флуоресцентну мікроскопію (із застосуванням барвника SYTO 16 для нуклеїнових кислот), раманівську спектроскопію та оптичний пінцет [21, 46, 47]. Аналіз отриманих даних щодо втрати рефрактивності спор, змін часу, тривалості і

кількості виділеної проростаючими спорами дипіколінової кислоти (DPA), яксравності DIC-зображення та інтенсивності флуоресценції спор допоміг встановити точні кореляції між різними подіями проростання, час, необхідний для його завершення та характер впливу різних чинників на гермінацію. Автори показали можливість одночасного отримання параметрів проростання для кількох окремих спор [21]. Результати моніторингу кінетики проростання окремих спор різних видів *Bacillus* (*B. cereus*, *B. megaterium* та *B. subtilis*) за допомогою раманівської спектроскопії та флуоресцентної мікроскопії наштовхнули авторів на думку про негативний вплив вологості теплової обробки на гермінацію спор через ймовірне пошкодження важливого для проростання білка (кортекс-літичного фермента CwlJ) та денатурацію нуклеїнових кислот [46, 47].

Застосування лазерного пінцета, спектроскопії комбінаційного розрізу та диференційно-інтерференційного контрасту або фазово-контрастної мікроскопії дозволило охарактеризувати ранню подію у проростанні спор *Bacillus* - фазу повільного витоку спорової DPA [48]. Вона знаменує собою початок гермінації спор і переходить у фазу швидкого вивільнення залишку DPA. Виявилось, що витік DPA починається не одразу після впливу поживних речовин. Час початку і тривалість цієї фази відрізняється серед спор різних бацил і значно залежить від умов проростання: температури та вмісту певних речовин. Але кількість DPA, що виділяється впродовж цієї фази, є відносно постійною (біля 20 % спорової DPA).

**Дослідження взаємозв'язку між стадіями утворення і відродження спор.** Донедавна здатність дослідника контролювати бактерії в мінливих умовах середовища мала обмеження. Це було серйозним недоліком, так як спороношення та відродження спор досліджували окремо, хоч обидва процеси тісно пов'язані і спільно визначають успіх виживання в умовах, що змінюються впродовж часу. Mutlu A. зі співавторами розробили метод мікроскопічного аналізу життєвого циклу, який дозволяє відстежувати історію життя окремих бактерій за змінних умов живлення і аналізувати зв'язок між споруляцією та відродженням спор [49]. Цей метод полягає у довготривалій одноклітинній покадровій мікроскопії з використанням гелевих прокладок та флуоресцентного маркера, здатного розрізняти ранні та пізні спори. Завдяки застосуванню розробленого методу доведено, що процеси споруляції і проростання пов'язані фенотиповою «пам'яттю», яка виникає внаслідок перенесення молекул з вегетативної клітини в спору. Традиційний погляд на спороношення як ізольовану ознаку реакції на стрес був поставлений під сумнів. Дослідження продемонстрували кореляцію між споруляцією та подальшою поведінкою утворених спор. Затримка часу спороношення, з одного боку, спричиняє зниження якості спор, з іншого, - дозволяє відбутися додатковим поділам клітин і, таким чином, збільшує кількість утворених спор. Автори

стверджують, що майбутні прикладні дослідження повинні враховувати конкурентний зв'язок між різними стратегіями життєвого циклу бацил – стратегією урожайності та стратегією якості спор [49, 50].

## Висновки

Розуміння процесу утворення спор, як важливої фази життєвого циклу бацил, розпочалося з розвитком методів мікроскопічного дослідження. Повна цитологічна модель споруляції розроблена завдяки електронній, флуоресцентній мікроскопії та генетичним методам дослідження.

Електронна мікроскопія дозволяє встановити стадію споруутворення (від I до VII). Для кількісної оцінки ходу та визначення синхронності процесу споруутворення більш придатні методи світлової мікроскопії. Мікроскопія фіксованих забарвлених препаратів забезпечує інформацією про наявність, розміри, форму, розташування спор. Застосування деяких методів забарвлення дозволяє диференціювати спори на стадіях спокою та проростання (метод Віртца-Конкліна) або відрізнити зрілі ендоспори від молодих (метод Пешкова).

Для моніторингу та кількісної оцінки процесу проростання спор використовують різні методи, засновані на виявленні фізичних, біологічних та хімічних ознак цього процесу. Поєднання кількох методів дозволяє більш різносторонньо і ґрунтовно охарактеризувати процес проростання спор. Дослідження, що продемонстрували кореляцію між споруляцією та відродженням спор, доводять необхідність подальшого вивчення цих процесів у нерозривному зв'язку.

## Research features of sporulation and hermination processes in representatives of the genus *Bacillus* Knysh O. V., Martynov A. V.

The formation of spores by bacilli is considered as a strategy of survival in adverse environmental conditions. The understanding of the sporulation process as an important phase of the life cycle of bacilli began with the development of microscopic methods. The complete cytological model of sporulation has been developed by electron, fluorescence microscopy and genetic research methods. Electron microscopy allows to establish the stage of spore formation (from I to VII). To quantify the course and determine the synchronicity of the spore formation process, light microscopy methods are more suitable. Spores are well detected in culture's native preparation by phase contrast microscopy starting from stage prespores (IV) and interference contrast microscopy starting from septation stage (II). Microscopy of fixed stained preparations provides information about the presence, size, shape and location of spores. The use of some staining methods allows to differentiate spores at the stages of dormancy and germination (Wirtz-Conklin spore stain) or to distinguish mature endospores from young ones (Peshkov's method). Methods of staining spores are based on the use of high temperatures and mordants, which provide loosening of strong shells of

spores and facilitate the penetration of the dye into their thick structure. At the decolorization step, the dye is removed from the vegetative cell due to weak binding to its structures, but it cannot be removed from the spores. The counter-staining step provides staining of the vegetative cell in a color different from the color of the spores. To identify and quantify the process of germination of spores use different methods based on the detection of physical, biological and chemical characteristics of this process. The transition from the phase of light dormant spores to the phase of dark germinating spores can be observed visually using phase-contrast microscopy. A simple way to study the process of germination of spores is to measure the optical density of the spore suspension in the wavelength range from 400 to 1000 nm (usually at 600 nm). But this method has a number of disadvantages. There are methods to avoid them. One of them is the determination of the activity of marker enzymes: proteases, extracellular hydrolases or esterases, which contribute to the differentiation of cells into vegetative form. An important biochemical marker of spore germination is the release of DPA (dipicolinic acid). It can be quantified by colorimetric, chromatographic, fluorescence spectroscopic, radiometric methods or dye displacement assay using a dual colorimetric-luminescent sensor system. A simple method to detect germination at an early stage is to determine the loss of heat resistance spores. Another effective way to study germination is to use specific dyes that bind to the nucleic acids of the spore nucleus as a result of impaired permeability of the inner membrane, degradation of DNA-binding proteins and cortex of the spores. The ATP bioluminescence method, based on the use of the luciferin / luciferase reaction, is a fast and sensitive way to detect germination. The combination of several methods allows characterizing the germination process more thoroughly and from different angles. Studies that have shown a correlation between sporulation and the subsequent behavior of spores suggest the need for further study of these processes in an inseparable relationship.

**Key words:** *Bacillus*, sporulation, germination, microscopy, biomarkers of bacterial spore germination.

## References

1. Logan N. A., Vos P. D. *Bacillus*. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, Wiley, 2015, 1–163. doi:10.1002/9781118960608.gbm00530
2. Cote C. K., Heffron J. D., Bozue J. A., Welkos S. L. *Bacillus anthracis* and other *Bacillus* species. *Molecular Medical Microbiology*, 2015, 1789–1844. doi:10.1016/b978-0-12-397169-2.00102-5
3. Setlow P. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology*, 2006, 101(3), 514–525. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02736.x
4. Riley E. P., Schwarz C., Derman A. I., Lopez-Garrido J. Milestones in *Bacillus subtilis* sporulation research. *Microbial Cell*, 2021, 8(1), 1–16. doi:10.15698/mic2021.01.739
5. Ryter A. Etude morphologique de la sporulation de *Bacillus subtilis* [Morphologic study of the sporulation of *Bacillus subtilis*]. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1965, 108, 40–60. PMID: 14289982
6. Ryter A., Schaeffer P., Ionesco H. Classification cytologique, par leur stade de blocage, des mutants de sporulation de *Bacillus subtilis* Marburg. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1966, 110(3), 305–315.
7. Piggot P. J., Coote J. G. Genetic aspects of bacterial endospore formation. *Bacteriol Rev*, 1976, 40(4), 908–962. doi:10.1128/mmbr.40.4.908-962.
8. Tehri N., Kumar N., Raghu H., Vashishth A. Biomarkers of bacterial spore germination. *Annals of Microbiology*, 2018, 68(9), 513–523. doi:10.1007/s13213-018-1361-z
9. Hitchins A. D., Kahn A. J., Slepecky R. A. Interference contrast and phase contrast microscopy of sporulation and germination of *Bacillus megaterium*. *Journal of bacteriology*, 1968, 96(5), 1811-1817.
10. Hussey M. A., Zayaitz A. Endospore stain protocol. *Laboratory Protocols*. American Society for Microbiology, Washington, DC, 2007, 285. Available from: <https://asm.org/ASM/media/Protocol-Images/Endospore-Stain-Protocol.pdf?ext=.pdf>.
11. Javaeed A., Qamar S., Ali S., et al. Histological Stains in the Past, Present, and Future. *Cureus*, 2021, 13(10), e18486. doi:10.7759/cureus.18486.
12. Senthilkumar M., Amaesan N., Sankaranarayanan A. Spore Staining and Biochemical Characterization of *Bacillus*. In *Plant-Microbe Interactions* (pp. 225-229). Springer Protocols Handbooks. Humana, New York, NY, 2021. doi:10.1007/978-1-0716-1080-0\_65
13. Schaeffer A. B., Fulton D. A simplified method of staining endospores. *Science*, 77(1990), 1933, 194. doi:10.1126/science.77.1990.194
14. Shen C., Zhang Y. Endospore stain practice. *Introductory Microbiology Lab Skills and Techniques in Food Science*, 2022, 27–30. doi:10.1016/b978-0-12-821678-1.00013-7
15. Bartholomew J. W., Mittwer T. O. D. A simplified bacterial spore stain. *Stain technology*, 1950, 25(3), 153-156. doi:10.3109/10520295009110979
16. Hamouda T., Shih A. Y., Baker J. R. A rapid staining technique for the detection of the initiation of germination of bacterial spores. *Letters in Applied Microbiology*, 2002, 34(2), 86–90. doi:10.1046/j.1472-765x.2002.01047.x
17. Hayama M., Oana K., Kozakai T., et al. Proposal of a simplified technique for staining bacterial spores without applying heat—successful modification of Moeller's method. *European journal of medical research*, 2007, 12(8), 356–359.
18. Hurst L. *Bacteriology*, Scientific e-Resources, 2019.
19. Seliber G. L. Large workshop on microbiology. M.: Higher. school 1962.
20. Katz A., Alimova A., Xu M., et al. Refractive index changes during germination of *Bacillus subtilis* spores. Vo-Dinh T., Grundfest W.S., Benaron D.A., Cohn G.E., editors. *Advanced Biomedical and Clinical Diagnostic Systems III* [Internet]. SPIE; 2005. doi:10.1117/12.5885
21. Kong L., Zhang P., Wang G., et al. Characterization of bacterial spore germination using phase-contrast and fluorescence microscopy, Raman spectroscopy and optical



- tweezers. *Nature Protocols*, 2011, 6(5), 625–639. doi:10.1038/nprot.2011.307
22. Pandey R., Ter Beek A., Vischer N. O., et al. Live cell imaging of germination and outgrowth of individual *Bacillus subtilis* spores; the effect of heat stress quantitatively analyzed with SporeTracker. *PloS One*, 2013, 8(3), e58972. doi:10.1371/journal.pone.0058972
23. Gupta S., Ustok F. I., Johnson C. L., et al. Investigating the functional hierarchy of *Bacillus megaterium* PV361 spore germination receptors. *Journal of bacteriology*, 2013, 195(13), 3045–3053. doi:10.1128/JB.00325-13
24. Ferencko L., Cote M. A., Rotman B. Esterase activity as a novel parameter of spore germination in *Bacillus anthracis*. *Biochemical and biophysical research communications*, 2004, 319(3), 854–858. doi:10.1016/j.bbrc.2004.05.062
25. Thakur G., Yadav A., Tehri N., et al. Rapid & novel microscopy technique to detect germination initiation and specificity in *Bacillus* spores. *Int J Res Pure Appl Microbiol*, 2013, 3(4), 134–138.
26. Rattray J. E., Chakraborty A., Li C., et al. Sensitive quantification of dipicolinic acid from bacterial endospores in soils and sediments. *Environmental Microbiology*, 2020, 23(3), 1397–1406. doi:10.1111/1462-2920.15343
27. Slieman T. A., Nicholson W.L. Role of dipicolinic acid in survival of *Bacillus subtilis* spores exposed to artificial and solar UV radiation. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(3), 1274–1279. doi:10.1128/AEM.67.3.1274-1279.2001
28. Setlow B., Atluri S., Kitchel R., et al. Role of dipicolinic acid in resistance and stability of spores of *Bacillus subtilis* with or without DNA-protective alpha/beta-type small acid-soluble proteins. *Journal of bacteriology*, 2006, 188(11), 3740–3747. doi:10.1128/JB.00212-06
29. Janssen F. W., Lund A. J., Anderson L. E. Colorimetric Assay for Dipicolinic Acid in Bacterial Spores. *Science*, 1958, 127(3288), 26–27. doi:10.1126/science.127.3288.26
30. Clear K. J., Stroud S., Smith B. D. Dual colorimetric and luminescent assay for dipicolinate, a biomarker of bacterial spores. *The Analyst*, 2013, 138(23), 7079–7082. doi:10.1039/c3an01658g
31. Fichtel Jö., Köster Jü., Rullkötter Jü., Sass H. Spore dipicolinic acid contents used for estimating the number of endospores in sediments. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 61(3), 522–532. doi:10.1111/j.1574-6941.2007.00354.x
32. Yilmaz M. D., Oktem H. A. Eriochrome Black T–Eu<sup>3+</sup> Complex as a Ratiometric Colorimetric and Fluorescent Probe for the Detection of Dipicolinic Acid, a Biomarker of Bacterial Spores. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(6), 4221–4225. doi:10.1021/acs.analchem.8b00576
33. Awasti N., Anand S. A fluorescence spectroscopic method for rapid detection of bacterial endospores: Proof of concept. *JDS Communications*, 2022, 3(2), 97–100. doi:10.3168/jdsc.2021-0170
34. Hou L., Song Y., Xiao Y., et al. Ratiometric fluorescence detection of dipicolinic acid based on Microporous Ln/melamine-terephthalaldehyde schiff base networks complex. *Talanta*, 2020, 209, 120534. doi:10.1016/j.talanta.2019.120534
35. Huang S. S., Chen D., Pelczar P. L., et al. Levels of Ca<sup>2+</sup>-dipicolinic acid in individual *Bacillus* spores determined using microfluidic Raman tweezers. *Journal of bacteriology*, 2007, 189(13), 4681–4687. doi:10.1128/JB.00282-07
36. Luu S., Setlow P. Analysis of the Loss in Heat and Acid Resistance during Germination of Spores of *Bacillus* Species. *Journal of Bacteriology*, 2014, 196(9), 1733–1740. doi:10.1128/jb.01555-14
37. Black E. P., Koziol-Dube, K., Guan, D., et al. Factors influencing germination of *Bacillus subtilis* spores via activation of nutrient receptors by high pressure. *Applied and environmental microbiology*, 2005, 71(10), 5879–5887. doi:10.1128/AEM.71.10.5879-5887.2005
38. Kong L., Zhang P., Yu J., et al. Monitoring the kinetics of uptake of a nucleic acid dye during the germination of single spores of *Bacillus* species. *Analytical chemistry*, 2010, 82(20), 8717–8724. doi:10.1021/ac1022327
39. Welkos S. L., Cote C. K., Rea K. M., Gibbs P. H. A microtiter fluorometric assay to detect the germination of *Bacillus anthracis* spores and the germination inhibitory effects of antibodies. *Journal of microbiological methods*, 2004, 56(2), 253–265. doi:10.1016/j.mimet.2003.10.019
40. Setlow B., Loshon C. A., Genest P. C., et al. Mechanisms of killing spores of *Bacillus subtilis* by acid, alkali and ethanol. *Journal of applied microbiology*, 2002, 92(2), 362–375. doi:10.1046/j.1365-2672.2002.01540.x
41. Sharma D. K., Prasad D. N. Rapid identification of viable bacterial spores using a fluorescence method. *Biotechnic & histochemistry*, 1992, 67(1), 27–29. doi:10.3109/10520299209110001
42. Bruno J. G., Mayo M. W. A color image analysis method for assessment of germination based on differential fluorescence staining of bacterial spores and vegetative cells using acridine orange. *Biotechnic & histochemistry : official publication of the Biological Stain Commission*, 1995, 70(4), 175–184. doi:10.3109/10520299509107309
43. Schichnes D., Nemson J. A., Ruzin S. E. Fluorescent staining method for bacterial endospores. *Microscope-London then Chicago*, 2006, 54(2), 91–93.
44. Bruno J. G. An acridine orange spore germination fluorescence microscopy versus spectral paradox. *Journal of fluorescence*, 2015, 25(1), 211–216. doi:10.1007/s10895-014-1498-5
45. Chollet R., Ribault S. Use of ATP Bioluminescence for Rapid Detection and Enumeration of Contaminants: The Milliflex Rapid Microbiology Detection and Enumeration System. *Bioluminescence - Recent Advances in Oceanic Measurements and Laboratory Applications*, InTech, 2012. doi:10.5772/37055
46. Wang G., Zhang P., Setlow P., Li Y. Q. Kinetics of germination of wet-heat-treated individual spores of *Bacillus* species, monitored by Raman spectroscopy and differential interference contrast microscopy. *Applied and environmental microbiology*, 2011, 77(10), 3368–3379. doi:10.1128/AEM.00046-11

47. Zhang P., Kong L., Wang G., et al. Monitoring the wet-heat inactivation dynamics of single spores of *Bacillus* species by using Raman tweezers, differential interference contrast microscopy, and nucleic acid dye fluorescence microscopy. *Applied and environmental microbiology*, 2011, 77(14), 4754–4769. doi:10.1128/AEM.00194-11
48. Wang S., Setlow P., Li Y. Q. Slow leakage of Ca-dipicolinic acid from individual bacillus spores during initiation of spore germination. *Journal of bacteriology*, 2015, 197(6), 1095–1103. doi:10.1128/JB.02490-14
49. Mutlu A., Trauth S., Ziesack M., et al. Phenotypic memory in *Bacillus subtilis* links dormancy entry and exit by a spore quantity-quality tradeoff. *Nat Commun*, 2018, 9, 69. doi:10.1038/s41467-017-02477-1
50. Mutlu A., Kaspar C., Becker N., et al. A spore quality–quantity tradeoff favors diverse sporulation strategies in *Bacillus subtilis*. *ISME J*, 2020, 14, 2703–2714. doi:10.1038/s41396-020-0721-4
- 51.