



ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ

УДК: 619: 57.012.4: 579.852.11

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2025.1.13

ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ *BACILLUS ANTHRACIS* ПРИ ДОЛГОСРОЧНОМ ХРАНЕНИИ

Кашеваров Г.С.* – канд. биол. наук, зав. лаб. морфологических исследований (ORCID 0000-0002-4520-7596); **Юсупова К.В.** – канд. ветеринар. наук, науч. сотр. лаб. морфологических исследований (ORCID 0000-0001-8597-3458); **Сантов В.Р.** – д-р биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. морфологических исследований (ORCID 0000-0001-9815-1314); **Артемьева Е.А.** – канд. ветеринар. наук, ст. науч. сотр., нач. отдела Государственной коллекции микроорганизмов (ORCID 0000-0002-6204-6077); **Мустафина Э.Н.** – канд. ветеринар. наук, вед. науч. сотр. отдела Государственной коллекции микроорганизмов (ORCID 0000-0002-1997-5575).

ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной
и биологической безопасности»

* kaschewarow@mail.ru

Ключевые слова: *Bacillus anthracis*, вегетативная форма, споровая форма, способы консервации, морфометрия, статистический анализ.

Key words: *Bacillus anthracis*, vegetative form, spore form, conservation methods, morphometry, statistical analysis.

Поступила: 20.01.2025 г.

Принята к публикации: 06.03.2025

Опубликована онлайн: 26.03.2025



РЕФЕРАТ

Многие специалисты области биологических и ветеринарных наук используют чистые культуры для работ в фундаментальных и прикладных направлениях. На степень чистоты культур могут повлиять различные факторы, в числе которых нарушение условий хранения. Не смотря на широкий выбор методов консервации микроорганизмов, актуальными и универсальными для воспроизведения в лабораторных условиях являются лиофилизация и низкотемпературная консервация. В связи с этим, отделением Государственной коллекции микроорганизмов был проведен подбор оптимальных методик и условий, подходящих для сохранения интересующих штаммов и их свойств в течение продолжительного времени. Цель настоящей работы – выяснение морфологического аспекта вопроса о влиянии различных условий консервации на биологические свойства *Bacillus anthracis* вегетативной и споровой форм в условиях длительного хранения: способность к прорастанию, спорообразованию и морфологические характеристики. В качестве объекта исследований использовали осажденную суспензию бактериальных клеток *Bacillus anthracis* вегетативной и споровой форм. Для проведения морфологического исследования образцы *B. anthracis* подготавливали по методике ультратонких срезов, контрастировали и просматри-

вали под пучком электронов на трансмиссионном электронном микроскопе. Статистическую обработку данных осуществляли в программах MS Excel и Statistica 6.0. Применяли непараметрический тест Манна–Уитни с последующей коррекцией по методу Бонферрони. По результатам исследований было установлено, что бактерии всех групп сохранили способность к прорастанию и спорообразованию. Морфология *Bacillus anthracis* в Государственной коллекции штаммов в целом соответствует данным, приводимым в литературных источниках, и условия хранения не оказали существенного влияния на эти характеристики.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

В качестве модели для исследований в области биологических и ветеринарных наук (микробиологических, эпизоотологических), как в фундаментальных, так и в прикладных направлениях (в том числе для биологической промышленности) важно использовать чистые культуры (штаммы) микроорганизмов [1; 2]. Работа с чистыми культурами может быть осложнена такими негативными явлениями, как невозможность восстановления биологических процессов, изменение фенотипических и генотипических особенностей, вызванные, например, нарушением условий хранения [3; 4]. Для нивелирования подобных проблем и в рамках задач Государственной коллекции микроорганизмов по качественной консервации и адаптации различных видов микроорганизмов необходимо проводить систематическую работу по определению оптимальных методов и конкретных условий, подходящих для сохранения интересующих штаммов в течение продолжительного времени.

Сегодня широко и эффективно применяют следующие способы консервации: субкультивирование, хранение в воде, водно-солевых растворах, под минеральным маслом, дегидратация, криоконсервация, лиофилизация и т. д. Наиболее удобными для исполнения в лабораторных условиях являются методы лиофилизации и низкотемпературной консервации в специальной криопротекторной среде [5].

Большой интерес в этом контексте вызывает возбудитель сибирской язвы, бактерия *Bacillus anthracis*, способная нанести тяжкий вред здоровью человека и сельскохозяйственных животных, обладая при этом высокой устойчивостью в

споровой форме, жизнеспособность которой может сохраняться десятилетиями [6].

Целью исследования было выяснение вопроса о влиянии различных условий консервации на биологические свойства *Bacillus anthracis* вегетативной и споровой форм в условиях длительного хранения: способность к прорастанию, спорообразованию и морфологические характеристики.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Была исследована морфология бактериальных клеток *Bacillus anthracis* вегетативной и споровой форм после длительного хранения с использованием различных методов консервации, а также при различных условиях фиксации. Исследование было проведено на базе отделения – Государственная коллекция микроорганизмов и лаборатории морфологических исследований ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ».

При низкотемпературном хранении по истечении 12 месяцев пробирки с культурами извлекали из морозильной камеры, оттаивали при комнатной температуре с последующим посевом их на МПА и МПБ. Также при консервации культур в глицерине из ампул были сделаны посевы на соответствующие питательные среды, определена их жизнеспособность и изучены биологические свойства согласно МУК 4.2.2413-08 «Лабораторная диагностика и обнаружение сибирской язвы».

Проверенные культуры, центрифугировали, отмывали и фиксировали 2,5% и 6% буферными растворами глутарового альдегида. Постфиксацию осуществляли тетраоксидом осмия, дегидратацию – проводкой через ряд растворов этилового спирта восходящей концентрации и аце-

тон. После дегидратации клетки импрегнировали смесью эпоновых смол, затем осуществляли полимеризацию смол, изготовление ультратонких срезов (на микро-томе ЛКВ-III) и монтаж срезов на блендах с полимерной подложкой (пиолоформ). Для контрастирования использовали стандартные электронно-микроскопические контрасты: уранилацетат и цитрат свинца. Материал для морфометрического анализа получали на просвечивающем электронном микроскопе методом случайных бесповторных полей и дальнейшего анализа в программе ImageJ (сборка FIJI) [7].

Статистическую обработку данных осуществляли в программах MS Excel и Statistica 6.0. Применяли непараметрический тест Манна-Уитни с последующей коррекцией по методу Бонферрони (исходный уровень значимости $\alpha = 0,05$ был скорректирован в зависимости от количества групп сравнения).

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Результаты показали, что исследуемые штаммы сохранили жизнеспособность, высев на средах дал рост бактерий и вегетативной, и споровой формы после консервации в различных условиях: низкотемпературная консервация (вегетативная и споровая форма), консервация в глицерине (споровая форма) (рис. 1). Изучение биологических свойств штаммов показало их соответствии паспортным данным.

Средняя длина клеток *B. anthracis* (табл. 1) составила в нашем исследовании $1,67 \pm 0,88$ мкм, а ширина – $0,93 \pm 0,20$ мкм (данные усреднены по всем группам). Эти цифры, с одной стороны, характеризуются большим разбросом, а с другой – довольно невелики: согласно литературным данным, длина *B. anthracis* составляет от 2,5–4,0 до 5,0 мкм [8], 10,0 [9] и даже 20,0 мкм [10]; в ширину – от 0,7–1 до 1,5 мкм. Такие результаты обусловлены, в первую очередь, спецификой проводившихся измерений: нами измерялись изображения ультратонких срезов – соответственно, при прохождении среза через расположенные случайным образом клетки веро-

ятность получения среза в плоскости, строго параллельной или перпендикулярной оси клетки (и при этом проходящей через центр клетки) довольно низка. Тем не менее, даже отмеченные нами максимальные значения длины клеток укладываются в обозначенный в литературе диапазон (а ширина чуть превышает его): длина 10 наиболее крупных клеток составила от 5,38 до 7,22 мкм, ширина – от 1,75 до 2,13 мкм.

Таким образом, полученные нами результаты измерений в целом не противоречат указанным для *B. anthracis* в литературных источниках, хотя и не достигают максимально возможных значений.

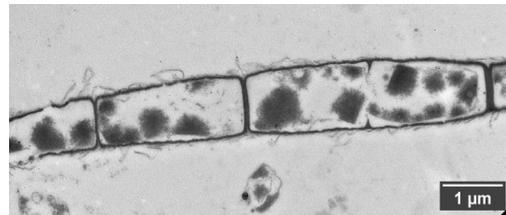


Рисунок 1 – Бактериальные клетки *Bacillus anthracis* после прорастания.

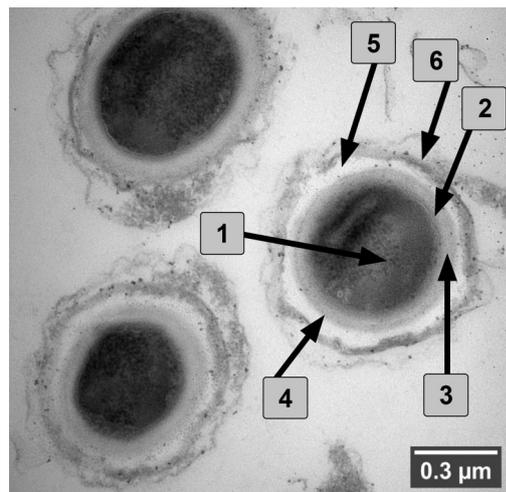


Рисунок 2 – Споры *Bacillus anthracis*.
 1 – содержимое споры (ДНК);
 2 – цитоплазматическая мембрана;
 3 – клеточная стенка споры;
 4 – кортекс; 5 – кора споры;
 6 – экзоспориум.

Таблица 1 – Средние размеры (M±Sd) бактериальных клеток *Bacillus anthracis* различных групп

Условия консервации	Форма	Фиксатор, %	Длина, мкм	Ширина, мкм	Коэффициент округлости
Глицерин	Споровая	2,5	1,65±0,77	0,88±0,14	0,83±0,14
Глицерин	Споровая	6,0	1,54±0,84	0,95±0,2*	0,87±0,14*
Низкотемпературная	Споровая	2,5	1,58±0,76	0,95±0,19	0,87±0,14
Низкотемпературная	Споровая	6,0	2,03±0,97*	1,02±0,26*	0,78±0,16*
Низкотемпературная	Вегетативная	2,5	1,57±0,96	0,83±0,16	0,79±0,17
Низкотемпературная	Вегетативная	6,0	1,71±0,85*	0,91±0,14*	0,76±0,17

* – статистически значимые отличия морфологического признака группы бактерий, зафиксированных 6 % глутаровым альдегидом, по сравнению с группой бактерий, зафиксированных 2,5 % глутаровым альдегидом.

Между бактериальными клетками разных групп отмечены небольшие, но статистически значимые различия. В разных условиях фиксации (фиксация глутаровым альдегидом 2,5 % и 6 %) бактериальные клетки показывают однородные изменения только в ширине клетки (в условиях более высокой концентрации глутарового альдегида ширина клетки выше), прочие же изменения разнонаправлены.

Кроме того, было проведено статистическое сравнение бактериальных клеток, зафиксированных одной и той же концентрацией фиксатора (2,5 % глутаровый альдегид), но находившихся в разных условиях хранения, а также споровой и вегетативной формы. С учётом поправки Бонферрони статистически значимые различия обнаружены между всеми группами по ширине клетки и коэффициенту округлости.

Тем не менее, несложно заметить, что с учётом величины стандартного отклонения аналогичные морфологические характеристики бактериальных клеток, находившихся в разных условиях хранения, а также подвергнутых фиксации различной концентрацией глутарового альдегида, лежат в пересекающихся диапазонах, поэтому на основании полученных данных нельзя сделать выводы о наличии влияния условий хранения на морфологию клеток *B. anthracis*.

Споры были обнаружены нами во всех исследованных группах в небольшом количестве (рис. 2). При этом наименьшее количество спор было отмечено в группе *B. anthracis* споровой формы в низкотемпературных условиях консервации (споры редки, встречаются единично). Поскольку количество спор, необходимых для качественного статистического анализа, было набрано не во всех группах, морфометрические характеристики спор по группам статистическому сравнению не подвергали, данные приводим по всем группам в целом. Споры округлые (коэффициент округлости составил 0,95±0,05 как для споровой, так и для вегетативной формы), размером порядка 0,9 × 0,7 мкм (в среднем 0,92±0,19 × 0,72±0,13 мкм для споровой и 0,91±0,23 × 0,71±0,17 мкм для вегетативной формы).

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Таким образом, бактерии всех групп сохранили способность как к прорастанию, так и к спорообразованию. Морфология штамма *Bacillus anthracis* из Государственной коллекции штаммов - возбудителей особо опасных болезней, используемых в ветеринарии и животноводстве, в целом соответствует данным, приводимым в литературных источниках, и условия хранения не оказали существенного влияния на эти характеристики.

STUDY OF THE MORPHOLOGICAL PROPERTIES OF *BACILLUS ANTHRACIS* IN LONG-TERM STORAGE

Kashevarov G.S. * – Candidate of Biological Sciences, head of laboratory for morphological studies (ORCID 0000-0002-4520-7596); **Yusupova K.V.** – Candidate of Veterinary Sciences, scientific researcher of laboratory for morphological studies (ORCID 0000-0001-8597-3458); **Saitov V.R.** – Doctor of Biological Sciences, leading scientific researcher of laboratory for morphological studies (ORCID 0000-0001-9815-1314); **Artemyeva E.A.** – Candidate of Veterinary Sciences, senior researcher, head of the State Collection of Microorganisms Department (ORCID 0000-0002-6204-6077); **Mustafina E.N.** – Candidate of Veterinary Sciences, leading researcher of the State Collection of Microorganisms Department (ORCID 0000-0002-1997-5575).

FSBSI «Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety»

* kaschewarow@mail.ru

ABSTRACT

Many specialists in the field of biological and veterinary sciences use pure crops for work in fundamental and applied areas. The degree of purity of crops can be influenced by various factors, including violation of storage conditions. Despite the wide range of methods for the conservation of microorganisms, lyophilization and low-temperature preservation are relevant and universal for reproduction in laboratory conditions. In this regard, the department of the State Collection of Microorganisms carried out the selection of optimal methods and conditions suitable for the preservation of the strains of interest and their properties for a long time. The purpose of this work is to clarify the morphological aspect of the question of the influence of various conservation conditions on the biological properties of *Bacillus anthracis* vegetative and spore forms under long-term storage conditions: the ability to germinate, spore formation and morphological characteristics. A precipitated suspension of *Bacillus anthracis* bacterial cells of vege-

tative and spore forms was used as an object of research. To carry out a morphological study, *B. anthracis* samples were prepared using the method of ultrathin sections, contrasted and viewed under an electron beam on a transmission electron microscope. Statistical data processing was carried out in MS Excel and Statistica 6.0 programs. The nonparametric Mann–Whitney test was used, followed by correction using the Bonferroni method. According to the results of the research, it was found that the bacteria of all groups retained the ability to germinate and sporulate. The morphology of *Bacillus anthracis* in the State Collection of Strains generally corresponds to the data given in the literature, and storage conditions did not significantly affect these characteristics.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Heylen K., Hoefman S., Vekeman B., Peiren J., De Vos P. Safeguarding bacterial resources promotes biotechnological innovation // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2012. – 94: 565–574.
2. Никитина З. К., Гордонова И. К., Насилов Э. М. Изучение коллагенолитических свойств коллекционных штаммов микромицетов при длительном хранении. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2021. – Т. 24, № 3. – С. 33–39.
3. Артемьева Е. А., Мельникова Л. А., Родионов А. П. Опыт длительного хранения референтного штамма С-141 возбудителя мелиоидоза (*Burkholderia pseudomallei*) // *Ветеринария сегодня.* – 2022. – Т. 11 (3). – С. 268–272.
4. Артемьева Е. А., Мельникова Л. А., Родионов А. П. Особенности подготовки и выдачи производственного штамма 5584 *Burkholderia mallei* в соответствии с требованиями биологической безопасности // *Ветеринария сегодня.* – 2021. – Т. 10, № 3. – С. 243–247.
5. Родионов А.П., Артемьева Е.А., Мельникова Л.А., Сахибуллина Д.М. Отработка режима низкотемпературной консервации штаммов *Bacillus anthracis* / А. П. Родионов, Е. А. Артемьева, Л. А. Мельникова, Д. М. Сахибуллина // *Ветеринария*

- сегодня. – 2023. – Т. 12, № 2. – С. 171-177.
6. Хаммадов, Н. И., Осянин К. А., Фаизов Т.Х., Фахрутдинов Н. А., Камалдинов И. Н., Усолец К. В. Генетические маркеры возбудителей особо опасных заболеваний, характеризующихся природной очаговостью // Ветеринарный врач. – 2020. – № 1. – С. 67-73
7. Schindelin, J. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis / J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise [et al.] // Nature methods. – 9(7). – 2012. – P. 676–682. DOI: 10.1038/nmeth.2019.
8. Герасимов В. Н., Дятлов И. А., Храмов М. В., Маринин Л. И., Голов Е. А., Миронова Р. И., Смирнов А. М., Бутко М. П. Морфопопуляционные и ультраструктурные особенности клеток возбудителя сибирской язвы, выделенных из макроорганизма // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2010. – № 3. – С. 51-55.
9. Задорина Ива Ивановна. Антигенная и молекулярно-генетическая оценка стабильности вакцинного сибирезвездного штамма Ланге после длительного хранения: диссертация ... кандидата ветеринарных наук: 06.02.02 / Задорина Ива Ивановна; [Место защиты: ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана»]. – Казань, 2020. – 108 с.
10. Золотарев А. Г., Дармов И. В., Пименов Е. В. Возбудители особо опасных инфекционных заболеваний бактериальной природы: морфология и ультраструктура. – М.: Медицина, 2006. – 272 с.
- REFERENCES**
1. Heylen K., Hoefman S., Vekeman B., Peiren J., De Vos P. Safeguarding bacterial resources promotes biotechnological innovation // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2012. – 94: 565-574.
2. Nikitina Z. K., Gordonova I. K., Nasibov E. M. Izuchenie kollagenoliticheskikh svojstv kollekcionnyh shtammov mikromicetov pri dlitel'nom hranenii. Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmaceuticheskoy himii. – 2021. – Т. 24, № 3. – С. 33–39. (In Russ.)
3. Artem'eva E. A., Mel'nikova L. A., Rodionov A. P. Opyt dlitel'nogo hraneniya referentnogo shtamma S-141 vozбудitelya melioidoza (*Burkholderia pseudomallei*) // Veterinariya segodnya. – 2022. – Т. 11 (3). – С. 268–272. (In Russ.)
4. Artem'eva E. A., Mel'nikova L. A., Rodionov A. P. Osobennosti podgotovki i vydachi proizvodstvennogo shtamma 5584 *Burkholderia mallei* v sootvetstvii s trebovaniyami biologicheskoy bezopasnosti // Veterinariya segodnya. – 2021. – Т. 10, № 3. – С. 243–247. (In Russ.)
5. Rodionov A.P., Artem'eva E.A., Mel'nikova L.A., Sahibullina D.M. Otrabotka rezhima nizkotemperaturnoj konservacii shtammov *Bacillus anthracis* / A. P. Rodionov, E. A. Artem'eva, L. A. Mel'nikova, D. M. Sahibullina // Veterinariya segodnya. – 2023. – Т. 12, № 2. – С. 171-177. (In Russ.)
6. Khammadox, N. I., Osyanin K. A., Faizov T.KH., Fakhrutdinov N. A., Kamaldinov I. N., Usol'tsev K. V. Geneticheskiye markery vozбудiteley osobo opasnykh zabolevaniy, kharakterizuyushchikhsya prirodnoy ochagovost'yu // Veterinarnyy vrach. – 2020. – № 1. – С. 67-73. (In Russ.)
7. Schindelin, J. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis / J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise [et al.] // Nature methods. – 9 (7). – 2012. – P. 676–682. DOI: 10.1038/nmeth.2019.
8. Gerasimov V.N., Dyatlov I.A., Hramov M.V., Marinin L.I., Golov E.A., Mironova R.I., Smirnov A. M., Butko M. P. Morfopopulyacionnye i ul'trastrukturnye osobennosti kletok vozбудitelya sibirskoj yazvy, vydelennyh iz makroorganizma // Doklady Rossijskoj akademii sel'skohozyajstvennyh nauk. – 2010. – № 3. – С. 51-55. (In Russ.)
9. Zadorina Iva Ivanovna. Antigennaya i molekulyarno-geneticheskaya ocenka stabil'nosti vakcinnogo sibireyazvennogo shtamma Lange posle dlitel'nogo hraneniya : dissertaciya ... kandidata veterinarnykh nauk : 06.02.02 / Zadorina Iva Ivanovna; [Mesto zashchity: FGBOU VO «Kazanskaya gosudarstvennaya akademiya veterinarnoj mediciny imeni N.E. Bauman»]. – Kazan', 2020. – 108 s. (In Russ.)
10. Zolotarev A. G., Darmov I. V., Pimenov E. V. Vozбудiteli osobo opasnykh infekcionnyh zabolevanij bakterial'noj prirody : morfologiya i ul'trastruktura. – M.: Medicina, 2006. – 272 s. (In Russ.)