

внешней среды: Метод. указ. – М.: ВО «Агропромиздат», 1989. – 30 с. – **15.** Лухнова Л.Ю., Пазылов Е.К., Мека-Меченко Т.В. и др. // Карантин и зооноз. инф. в Казахстане. – 2002. – № 6. – 56–60. – **16.** Маринин Л.И., Онищенко Г.Г., Степанов А.В. и др. Микробиологическая диагностика сибирской язвы. – М.: ВУНМИЦ МЗ РФ, 1999. – 221 с. – **17.** Новые методы иммуноанализа / Под ред. У.П.Коллинз. – М.: Мир, 1991. – 280 с. – **18.** Онищенко Г.Г., Васильев Н.Т., Литусов Н.В. и др. Сибирская язва: Акт. асп. микробиол., эпидемиол., клин., диагн., лечения и профилакт. – М.: ВУНМИЦ МЗ РФ, 1999. – 448 с. – **19.** Покровский В.И., Черкасский Б.Л. // Эпидемиол. и инф. бол. – 2002. – № 2. – С. 57–60. – **20.** Смирнова Н.И., Кутырев В.В. // Мол. генет., микробиол., вирусол. – 2006. – № 2. – С. 9–19. – **21.** Терешкина Н.Е. Изучение капсульных и бескапсульных форм *Vibrio cholerae* O139 с использованием поли- и моноклональных антител: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Саратов, 2004. – 23 с. – **22.** Черкасский Б.Л. Эпидемиология и профилактика сибирской язвы. – М.: ИНТЕРСЭН, 2002. – 384 с. – **23.** Campbell G.A., Mutharasan R. // Biosens. Bioelectron. – 2006. – Vol. 21, № 9. – P. 1684–1692. – **24.** Campbell G.A., Mutharasan R. // Anal. Chem. – 2007. – Vol. 79, N 3. – P. 1145–1152. – **25.** Farrell S., Halsall H.B., Heineman W.R. // Analyst. – 2005. – Vol. 130, N 4. – P. 489–497. – **26.** Feodorova V.A., Gromova O.V., Devdariani Z.L. et al. // J. Med. Microbiol. – 2001. – Vol. 50, N 6. – P. 499–508. – **27.** Hindson B.J., McBride M.T., Makarewicz A.J. et al. // Anal. Chem. – 2005. – Vol. 77, N 1. – P. 284–289. – **28.** Hoile R., Yuen M., James G., Gilbert G.L. // Forensic. Sci. Int. – 2007. – Vol. 171, N 1. – P. 1–4. – **29.** Klein-Albers C., Bohm R. // Zentralbl. Veterinarmed. B. – 1989. – B. 36, N 3. – S. 226–230. – **30.** Kozel T.R., Murphy W.J., Brandt S. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004. – Vol. 101, N 14. – P. 5042–5047. – **31.** Long G.W., O'Brien T. // J. Appl. Microbiol. – 1999. – Vol. 87, N 2. – P. 214. – **32.** Mabry R., Brasky K., Geiger R. et al. // Clin. Vaccine Immunol. – 2006. – Vol. 13, N 6. – P. 671–677. – **33.** McBride

M.T., Masquelier D., Hindson B.J. et al. // Anal. Chem. – 2003. – Vol. 75, N 20. – P. 5293–5299. – **34.** Mock M., Fouet A. // Annu. Rev. Microbiol. – 2001. – Vol. 55. – P. 647–671. – **35.** Muller J.D., Wilks C.R., O'Riley K.J. et al. // Aust. Vet. J. – 2004. – Vol. 82. – P. 220–222. – **36.** Sastry K.S., Tuteja U., Batra H.V. // Indian J. Exp. Biol. – 2003. – Vol. 41. – P. 123–128. – **37.** Stopa P.J. // Cytometry. – 2000. – Vol. 41. – P. 237–244. – **38.** Stratis-Cullin D.N., Griffin G.D., Mobley J. et al. // Anal. Chem. – 2003. – Vol. 75, N 2. – P. 275–280. – **39.** Swiecki M.K., Lisanby M.W., Shu F. et al. // J. Immunol. – 2006. – Vol. 176, N 10. – P. 6076–6084. – **40.** Wang D., Carroll G.T., Turro N.J. et al. // Proteomics. – 2007. – Vol. 7, N 2. – P. 180–184. – **41.** Zahavy E., Fisher M., Bromberg A., Olshevsky U. // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – Vol. 69. – P. 2330–2339.

N.E.Tereshkina, Z.L.Devdariani

Present Status of the Anthrax Pathogen Immunodiagnosis

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov

Analysis of the recent domestic and foreign publications concerning the problems of anthrax immunodiagnosis is presented in the current review. The major achievements in the development of the procedures to detect *Bacillus anthracis* and its antigens using various immunodiagnostic assays are briefly characterized. The most important problems are discussed in connection with the efforts to increase the efficacy of the modern immunodiagnostic kits and their introduction into practice.

Key words: *Bacillus anthracis*, immunodiagnosis, polyclonal antibodies, monoclonal antibodies, immunodiagnostic kits.

Поступила 07.09.97.

УДК 616.981.452

Е.В.Чеботарев, А.А.Бывалов, Н.Н.Зайцева, В.В.Роман, А.В.Кожемяко

КИСЛОРОДЗАВИСИМОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ *YERSINIA PESTIS*

ФГУ «48 Центральный НИИ Минобороны России», Киров

Предложен способ восстановления жизнеспособности замороженных при температуре минус (20±2) °С и длительно (7–16 мес.) хранившихся культур *Yersinia pestis*. Способ заключается в аэрировании 10 см³ оттаявшей культуры в стеклянном флаконе вместимостью 120 см³ встряхиванием на шуттель-аппарате под ватными пробками при температуре (27±1) °С. Показана кислородная и энергетическая зависимость процесса репарации поврежденных бактерий. Восстановление жизнеспособности предотвращается в атмосфере аргона, при ингибировании дыхания клеток цианидом (KCN) и разобщении окислительного фосфорилирования 2,4-динитрофенолом (2,4-ДНФ). Способность к репарации проявляют бактериальные культуры, сохранившие энергозависимую ауторегуляцию дыхательной активности, оцениваемую по предложенным параметрам дыхания, прежде всего по величине метаболического дыхательного контроля (МДК).

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, репарация бактериальных клеток, метаболический дыхательный контроль (МДК).

Разработка способов поддержания и восстановления у бактериальных культур при их длительном хранении таких значимых критериев жизнеспособности, как рост и размножение в питательных средах, устойчивость к действию неблагоприятных (экстремальных) факторов внешней среды на уровне исходных параметров является одной из важных задач практической микробиологии [4].

Жизнеспособность микроорганизмов – это не только живое состояние исследуемых объектов, но и их генетическая и фенотипическая полноценность, способность нормально функционировать в различных, в том числе и в неблагоприятных усло-

виях, устойчивость и толерантность к ним, адаптационные и компенсаторные возможности, защитные свойства клеток, их ростовой и репродуктивный потенциалы [7].

При действии экстремальных факторов на живую систему, к числу которых относятся «замораживание – оттаивание», тепловое воздействие, длительное хранение бактериальных культур, имеют место следующие явления [1]: возникновение первичных повреждений структур и клеточных компонентов; развитие патологического процесса, т.е. деструктивные последствия и функциональные нарушения, вызванные выпадением или функциональным сдвигом нарушенного звена ин-

тегральной системы жизнеобеспечения клетки; адаптивный отклик клетки и репарация полученных повреждений.

Известно, что способность к репарации носит у поврежденных микроорганизмов энергозависимый характер, являясь, в то же время, одним из наиболее информативных показателей их физиологического состояния [3, 10–14]. На примере *Escherichia coli* и *Salmonella anatum* показано, что восстановление ростовых свойств у грамотрицательных бактерий после замораживания-оттаивания требует энергетических затрат: восстановление замедляется при разобщении реакций окислительного фосфорилирования введением в репарационную среду 2,4-динитрофенола (2,4-ДНФ), а также при ингибировании дыхания цианидом и азидом [11–13]. Следовательно, эффективность процессов восстановления жизнеспособности зависит не только от подбора оптимальных условий репарации (определенного температурно-временного режима, состава среды восстановления и т.д.), но и от исходного уровня энергизованности бактерий. При одинаковых условиях репарации клеток с различной степенью повреждения эффективность восстановления жизнеспособности определяется глубиной дисрегуляции энергозависимых функций бактерий. Последнее обстоятельство позволяет не только подобрать условия компенсации функциональных свойств у поврежденных микроорганизмов, но и одновременно оценить значимость разработанных нами ранее параметров ауторегуляции дыхательной активности для характеристики физиологического состояния бактерий *Yersinia pestis* и их способности к репарации некоторых свойств [9].

Важная роль кислородзависимых процессов в реализации многих функциональных свойств аэробных и факультативно-анаэробных бактерий [6] позволяет предположить, что аэрирование после оттаивания длительно хранившихся в замороженном состоянии культур *Y. pestis*, имеющих в своем составе клетки с нарушенными функциями (например, способность к росту на плотных питательных средах, устойчивость к повышенным температурам), будет обеспечивать восстановление жизнеспособности у поврежденных бактерий.

Материалы и методы

В работе использовали глубинные культуры *Y. pestis* (штамм ЕВ), выращенные в жидких средах на основе ферментативного гидролизата мяса крупного рогатого скота в лабораторных культиваторах ЛКВ (Швеция) с рабочим объемом 1,0 л в течение 30 ч при температуре $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$ и pH $7,0 \pm 0,3$. По окончании выращивания к культурам добавляли стабилизирующую жидкость (в объемном соотношении 1:1), содержащую сахарозу (3 % вес.), глицерин (6 % об.) и фосфатный буфер $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ (0,2 % об.). Полученные таким образом стабилизированные культуры разливали по 30 см³ в стеклян-

ные флаконы вместимостью 120 см³ и хранили под ватно-марлевыми пробками при температуре минус $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$ до 16 мес.

После хранения и оттаивания в течение 30–40 мин при температуре $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$ исследуемые культуры разливали по 10 см³ в стеклянные флаконы вместимостью 120 см³ и аэрировали в кислородсодержащей атмосфере воздуха встряхиванием на шуттель-аппарате при температуре $(27 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ под ватными пробками. При частоте встряхивания 140–160 качаний в минуту степень аэрации культур по величине сульфитного числа (K_s) составила 0,6–0,7 мМО₂/дм³·мин. Культуры аэрировали в предварительных опытах от 30 до 180 мин, в дальнейших экспериментах – в течение 90 мин. В качестве контроля использовали культуры в бескислородной газовой среде аргона во флаконах с плотно закрытыми резиновыми пробками, а также культуры, хранившиеся в процессе опыта во флаконах под ватно-марлевыми пробками при температуре $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$ без встряхивания.

Жизнеспособность свежеприготовленных, хранившихся и аэрированных культур оценивали по содержанию в них колониеобразующих микроорганизмов (биологическая концентрация) и по их устойчивости к повышенной температуре (терморезистентность).

Биологическую концентрацию (БК) определяли общепринятым «чашечным» методом, высевая разведенные клеточные культуры на плотную питательную среду (ППС) в чашках Петри и подсчитывая число колоний через 3 сут выращивания при температуре $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$. Биологическую концентрацию свежеприготовленных культур принимали за 100 %.

Для определения терморезистентности исследуемые культуры прогревали при температуре $(47 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ в течение 1 ч в термостате в объеме 5 см³ в стеклянных пробирках под ватно-марлевыми пробками. Устойчивость бактерий к прогреву (Π_{47}) определяли как частное от деления разницы десятичных логарифмов БК культуры до и после температурного воздействия на продолжительность прогрева $[\Pi_{47} = (\lg \text{БК}_{\text{исх.}} - \lg \text{БК}_{\text{прогр.}})/1 \text{ ч}]$.

Степень повреждения барьерных функций клеточных мембран определяли полярографически по величине стимуляции дыхания бактерий экзогенным никотинамидадениндинуклеотидом восстановленным ($\text{СД}_{\text{НАДН}}$) согласно методике [2]. Для интактных барьерных структур $\text{СД}_{\text{НАДН}}$ равен 1,00. Чем выше значения $\text{СД}_{\text{НАДН}}$, тем глубже нарушения избирательной проницаемости бактериальных цитоплазматических мембран.

Дыхательную активность бактериальных культур измеряли при температуре $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$ на лабораторной установке для полярографической (хроноамперометрической) регистрации скорости убыли кислорода из среды инкубации, применяя поляризующийся платиновый электрод открытого типа [8]. Рабочий объем полярографической ячейки – 2 см³. В качестве среды инкубации использовали водно-

солевой раствор следующего состава: 60 см³ 0,15 М Na₂HPO₄·2H₂O; 40 см³ 0,075 М KH₂PO₄; 0,4 см³ 1 М MgCl₂·6H₂O, (рН 7,15). Растворы субстратов (глюкоза, НАД·Н), разбавителя – протонофора (2,4-динитрофенол) и ингибитора дыхания (цианид калия) готовили на среде, идентичной по составу среде инкубации. Исходная концентрация кислорода в среде инкубации – 120 нмоль O₂/см³. Объемы исследуемых культуральных проб составляли 10–50 мкл из расчета создания в среде инкубации полярографической ячейки общей концентрации, примерно, (1–3)·10⁹ кл./см³.

По полярограммам рассчитывали следующие параметры дыхания: V_{энд.} – удельная скорость эндогенного дыхания бактерий, нмоль O₂/млрд кл.·мин; СД_{гл.25} – коэффициент стимуляции эндогенного дыхания бактерий глюкозой в конечной концентрации 25 нмоль/см³, отн. ед.; МДК – коэффициент метаболического дыхательного контроля, отн. ед. Характеристика и способы расчета параметров дыхания клеток *Y. pestis* приведены в опубликованной ранее работе [9].

Статистическую обработку результатов изменений проводили в соответствии с рекомендациями Г.Ф.Лакина [5], вычисляя средние арифметические значения показателей и доверительные интервалы их отклонений (X±I₉₅) для уровня вероятности 95 %. Достоверность различий при необходимости определяли, сравнивая расчетные (t_{расч.}) и табличные (t_{табл.}) значения критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Предварительные опыты со стабилизированными культурами *Y. pestis*, хранившимися при температуре минус (20±2) °С в течение 7–12 мес., результаты которых представлены на рисунке, показали, что аэрирование оттаявших культур приводит к существенному снижению их термочувствительности уже через 30 мин от начала аэрации. Параметр П₄₇ достигает статистически значимого минимума (соответствующего уровню терморезистентности свежеприготовленных культур) через 90 мин встряхивания на шуттель-аппарате и незначительно меняется в течение дальнейших 90 мин аэрирования.

Как следует из данных, представленных на рисунке, уменьшение термочувствительности предотвращается введением в культуру перед аэрацией разбавителя – протонофора 2,4-динитрофенола (2,4-ДНФ) и ингибитора дыхания цианида калия (KCN). Причем о полном ингибировании дыхания цианидом судили по отсутствию стимуляции дыхательной активности клеток глюкозой (СД_{гл.25} = 1,00), так как культуры, сохраняющие способность окислять глюкозу (СД_{гл.25} > 1,00) при практически полном подавлении эндогенного дыхания ингибитором, проявляли, хотя и в меньшей степени, способность к репарации.

В контрольных пробах, встряхиваемых на шуттель-аппарате без доступа кислорода в атмос-

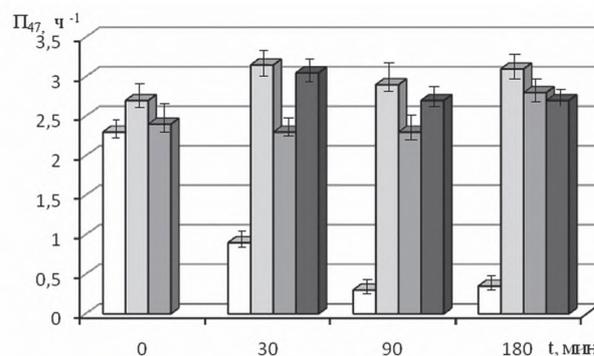
фере аргона (рисунок), термостойчивость бактерий статистически значимо не менялась по сравнению с исходной величиной, и это свидетельствует об определяющей роли кислородзависимых метаболических реакций в процессе репарации.

Таким образом, приведенные на рисунке данные подтверждают существенное увеличение терморезистентности длительно хранившихся культур *Y. pestis* в результате аэрирования и свидетельствуют об энергезависимом характере репарации, так как и разбавитель окислительного фосфорилирования и ингибитор дыхания предотвращают данный процесс. В дальнейшем мы применяли полуторачасовой режим аэрирования проб в кислородсодержащей атмосфере воздуха в качестве теста на способность бактерий в составе различных культур к репарации.

Использованные в опытах культуры проявили различную способность к кислородзависимой репарации в заданных условиях, и по степени выраженности данного признака они были разделены на три условные группы: А, Б и В. Результаты сравнительного определения способности к репарации аэрированием в кислородсодержащей атмосфере 13 стабилизированных культур с различными сроками хранения в замороженном состоянии и последующем оттаивании представлены в табл. 1

В группу А объединили культуры, аэрирование которых приводило не только к достоверному уменьшению термочувствительности, но и к достоверному увеличению жизнеспособности по показателю БК. В группу Б вошли культуры, способные к восстановлению только термостойчивости, а в группу В – культуры, не проявляющие способности к репарации ни по одному из вышеперечисленных показателей.

После полуторачасового аэрирования культуры групп А и Б демонстрируют высокую термостойчивость (0,29±0,06 ч⁻¹ и 0,28±0,08 ч⁻¹, соответственно), которая близка уровню, определенному у свежеприготовленных (до замораживания) серий культуры, а именно: (0,20±0,04) ч⁻¹. Кроме того, в результате аэ-



Изменение термочувствительности бактерий *Y. pestis* по показателю П₄₇ в зависимости от продолжительности аэрирования культур, доступа к ним кислорода, наличия в пробах ингибитора дыхания KCN и разбавителя окислительного фосфорилирования 2,4-ДНФ:
 □ – проба без добавок; □ – в пробе 2,4-ДНФ, 1·10⁻⁴ М;
 ■ – в пробе KCN, 1·10⁻⁴ М; ■ – проба без добавок и без доступа кислорода (атмосфера аргона), контроль

Таблица 1

Изменение биологической концентрации (БК)¹⁾, термочувствительности (П₄₇) и степени нарушения барьерных функций клеточных мембран (СД_{НАДН}) в результате полторачасового аэрирования длительно хранившихся культур *Y. pestis* (X±J₉₅, n = 8–10)

Группа	Номер культуры	Срок хранения, мес.	Показатели до аэрирования			Показатели после аэрирования		
			БК, %	П ₄₇ , ч ⁻¹	СД _{НАДН} , отн. ед.	БК, %	П ₄₇ , ч ⁻¹	СД _{НАДН} , отн. ед.
А	1, 2	7–9	72,3±11,4	0,99±0,12	1,06±0,06	94,1±8,1	0,29±0,06	1,00
Б	1 ²⁾ , 3–11	7–16	59,2±7,2	2,36±0,19	2,33±0,78	58,5±7,0	0,28±0,08	1,20±0,13
В	12, 13	11–12	66,1±16,0	2,76±0,28	1,72±0,24	60,2±14,3	2,65±0,70	1,50±0,28

Примечания: ¹⁾ Изменение БК приводится в процентах относительно исходной биологической концентрации свежеприготовленных культур (принята за 100 %); ²⁾ Культура № 1 исследована повторно после 3-кратного цикла «замораживание минус (20±2) °С – оттаивание(20±2) °С».

рирования культур групп А и Б достоверно уменьшается по показателю СД_{НАДН} степень повреждения барьерных функций бактерий, определяемая уровнем структурно-функциональной организации клеточных мембран. Исходно более низкие значения СД_{НАДН} в культурах группы В обусловлены, по всей видимости, общим снижением уровня дыхательной активности бактерий данной группы, что подтверждают приведенные ниже результаты экспериментов.

Дополнительное воздействие на культуру № 1 (группа А) трехкратного цикла «замораживание минус (20±2) °С – оттаивание (20±2) °С» приводит к углублению структурно-функциональных повреждений бактерий и, как следствие, к утрате ими способности к восстановлению ростового и репродуктивного потенциалов при сохранении способности к репарации терморезистентности, что характерно для культур группы Б.

Из данных литературы известно, что репарационные процессы в поврежденных клетках ряда грамотрицательных факультативно-анаэробных микроорганизмов (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus*) сопровождаются усиленным синтезом липидов мембранных структур и перестройкой их жирно-кислотного состава [10]. Не исключено, что регистрируемая репарация барьерных функций, равно как и увеличение терморезистентности бактерий *Y. pestis*, также обусловлены изменениями в липидном составе клеточных мембран, поскольку ингибитор биосинтеза липидов церулений, добавленный в пробы культур № 8 и 9 в конечной концентрации 300 мкг/см³, полностью предотвращал процесс повышения их термостойчивости аэрированием.

Таблица 2

Параметры дыхания¹⁾ длительно хранившихся культур *Y. pestis* (X±J₉₅, n = 8–10)

Группа	Номер культуры	Срок хранения, мес.	Параметры дыхания		
			V _{энд.} , нмоль O ₂ /млрд кл.·мин	СД _{пл.25} , отн. ед.	МДК, отн. ед.
А	1, 2	7–9	2,0±0,8	2,93±0,51	2,13±0,29
Б	1 ²⁾ , 3–11	7–16	1,8±0,8	2,70±0,50	1,64±0,18
В	12, 13	11–12	1,4±0,4	1,13±0,02	1,00

Примечания: ¹⁾ Наименование параметров дыхания приводится в тексте. ²⁾ Культура № 1 исследована повторно после 3-кратного цикла «замораживание минус (20±2) °С – оттаивание(20±2) °С».

Как следует из данных табл. 1, способность к репарации не зависит от продолжительности хранения культур в замороженном состоянии, от содержания в их составе бактерий, сохранивших после хранения и оттаивания способность к образованию колоний на ППС в чашках Петри (БК), в том числе (и это отмечено для культур групп Б и В) после дополнительного температурного воздействия (П₄₇) на них. В то же время выявленные закономерности и групповые различия в восстановлении жизнеспособности бактерий в составе длительно хранившихся культур хорошо согласуются с результатами оценки уровня регуляции их дыхательной активности по предложенным нами ранее параметрам [9]. Прежде всего это относится к показателю метаболического дыхательного контроля (МДК), информативность которого для оценки физиологического состояния бактерий была продемонстрирована на примере развивающихся и переживающих культур *Y. pestis*.

В табл. 2 приводятся статистические значения параметров дыхания исследованных до аэрирования культур, входящих в состав групп А, Б и В, которые свидетельствуют о том, что культуры группы А отличаются достоверно более высокими значениями МДК (t_{расч.} = 2,96, t_{табл.} = 2,18), по сравнению со значениями МДК культур группы Б. Утрата метаболического дыхательного контроля (МДК = 1,00) у клеток группы В при слабой стимуляции дыхания глюкозой и низкой скорости окисления эндогенных субстратов свидетельствует о более глубоком, нежели у культур групп А и Б, нарушении энергозависимой ауторегуляции дыхания бактерий *Y. pestis*, что, по-видимому, и предопределяет их неспособность к репарации.

Таким образом, можно полагать, что энергопродуктивные метаболические процессы, эффективность которых отражает уровень ауторегуляции дыхательной активности поврежденных микроорганизмов, определяют способность бактерий (либо отсутствие таковой) к восстановлению ростовых свойств и термостойчивости при аэрировании длительно хранившихся культур *Y. pestis*, и параметры дыхания, прежде всего метаболический дыхательный контроль (МДК), характеризуют эффективность внутриклеточных энергозависимых реакций, участвующих в процессах репарации. В то же время полученные экспериментальные данные о кислородзависимой репарации

бактерий как активном метаболическом процессе позволяют рассматривать его в качестве самостоятельного теста для определения глубины нарушения жизнеспособности клеток при действии экстремальных факторов на бактериальные культуры.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александров В.Я. Клетки, макромолекулы и температура. – Л.: Наука, 1975. – 330 с. – 2. Игнатов С.Г., Красильников В.А., Перельгин В.В. и др. // Биохимия. – 1981. – Т. 46, вып. 11. – С. 1996–2003. – 3. Игнатов С.Г., Андреева О.В., Евдокимова О.А. и др. // Биохимия. – 1982. – Т. 47, вып. 10. – С. 1621–1623. – 4. Кробиология и биотехнология / Под ред. А.А.Цуцаевой. – Киев: Наукова думка, 1987. – 5. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1980. – 6. Лукьянова Л.Д., Балмуханов Б.С., Уголев А.Т. Кислородзависимые процессы в клетке и ее функциональное состояние. – М.: Наука, 1982. – 302 с. – 7. Луста К.А., Фихте Б.А. Методы определения жизнеспособности микроорганизмов / Под ред. В.К.Еропкина. – Пушино: ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1990. – С. 8–45. – 8. Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом. Под ред. Г.М.Франка. – М.: Наука, 1973. – 9. Чеботарев Е.В., Пименов Е.В., Бывалов А.А. и др. // Пробл. особо опасных инф. – 2006. – Вып. 2 (91). – С. 49–53. – 10. Veuchat L.R. // Adv. Appl. Microbiol. – 1978. – Vol. 23. – P. 219–243. – 11. Ray B., Janssen D.W., Busta F.F. // Appl. Microbiol. –

1972. – Vol. 23, N 4. – P. 803–809. – 12. Ray B., Jereski J.I., Busta F.F. // Appl. Microbiol. – 1971. – Vol. 22, N 3. – P. 401–407. – 13. Ray B., Speck M.L. // Appl. Microbiol. – 1972. – Vol. 24, N 4. – P. 585–590. – 14. Tain V.K., Gupta I., Lata K. // Realist. Res. – 1982. – Vol. 92, N 3. – P. 463–473.

E.V.Chebota'yov, A.A.Byvalov, N.N.Zaitseva,
V.V.Roman, A.V.Kozhemyako

Oxygen-Dependent Recovery of *Yersinia pestis* Viability

48th Central Research Institute of the RF Defense Ministry, Kirov

The following technique is offered for restoration of viability of *Yersinia pestis* cultures lyophilized at $(-20 \pm 2)^\circ\text{C}$ and stored for a long time (7–16 months): 10 cm³ melted culture in a 120 cm³ glass bottle under cotton stoppers is aerated by rocking in a shaker at $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$. The process of reparation of the injured bacteria was shown to depend on the presence of the oxygen and energetic sources. Viability reparation was prevented in the atmosphere of argon, when cells' breath was inhibited by cyanide (KCN), and in the case of uncoupling of the oxidative phosphorylation process by 2,4-dinitrophenol (2,4-DNF). Reparation capability was manifested by the bacterial cultures that had retained energy-dependent autoregulation of the breathing activity, estimated according to the respiration parameters, and especially by the magnitude of the metabolic breathing control (MBC).

Key words: *Yersinia pestis*, bacterial cells reparation, metabolic respiration control (MRC).

Поступила 04.06.07.

БИОТЕХНОЛОГИЯ

УДК 616.932:615.371/.372

О.А.Волох, И.А.Шепелёв, С.П.Заднова, И.М.Крепостнова, С.А.Еремин

ИЗУЧЕНИЕ БИОКИНЕТИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ И ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММОВ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА – ПРОДУЦЕНТОВ ПРОТЕКТИВНЫХ АНТИГЕНОВ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ ВНЕДРЕНИЯ В ПРОИЗВОДСТВО

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Представлены основные биокинетические показатели роста штаммов *V. cholerae* O1 (классического и эльтор биоваров), O139, не O1 / не O139 – серогрупп, являющихся продуцентами основных протективных антигенов (O1 и O139 антигенов, холерного токсина I и II типов, В-субъединицы холерного токсина II типа, токсин-регулируемых пилей адгезии) при глубинном культивировании. Для каждого штамма определены оптимальные условия (питательные среды, pH, время культивирования, использование дополнительного источника углеводов) для максимальной продукции протективных антигенов в условиях производства, что позволит использовать их для изготовления более эффективных вакцинных препаратов, а также для получения в очищенном виде основных протективных антигенов *V. cholerae* с целью создания диагностических препаратов.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, глубинное культивирование, протективные антигены.

Холера – опасное эпидемическое заболевание, вызываемое токсигенными штаммами *Vibrio cholerae* O1 (классического и эльтор биоваров) и O139 серогрупп. В связи с сохранением эндемичных по холере территорий в Азии и Африке и постоянной миграцией населения обстановка по холере в мире и Российской Федерации остается неблагоприятной. Поэтому существует настоятельная необходимость создания химических холерных вакцин, эффективных против всех трех эпидемических вариантов *V. cholerae*, а также диагностических тест-систем, на основе очищенных основных протективных антигенов, для оценки качества выпускаемых вакцинных препаратов.

В России производится химическая вакцина «холероген-анатоксин», содержащая O1-антиген сероваров Инаба и Огава и анатоксин, а также ряд ферментов – протеазу, фосфолипазу, нейраминидазу [2], формирующая анитоксический и антибактериальный иммунитет. Для изготовления указанной вакцины используют штамм O1 серогруппы классического биовара *V. cholerae* 569 серовара Инаба, который продуцирует незначительное (9 мкг/мл) количество холерного токсина (ХТ) в среду выращивания и синтезирует незначительное количество токсин-регулируемых пилей адгезии (ТКПА) на поверхности клеток, выявляющихся только высокочувстви-