

Д.А.Будыка, А.И.Бондаренко, А.А.Фисун, Н.В.Абзаева, Г.Ф.Иванова, С.Е.Гостищева, С.М.Руднев

## КАЧЕСТВЕННЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ МИКРОБНЫХ КЛЕТОК ШТАММА *YERSINIA PESTIS* EV В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИХ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ПРИ РАЗНЫХ ТЕМПЕРАТУРНЫХ УСЛОВИЯХ БИОТЕХНОЛОГИИ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПРЕПАРАТА ВАКЦИНЫ ЧУМНОЙ

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь

Выбор в пользу температурного режима культивирования клеток вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV ( $21\pm 1$ ) °C вместо ( $27\pm 1$ ) °C при изготовлении вакцины чумной живой экспериментально подтверждает известный факт включения в биоструктуры клеточных мембран при низких температурах повышенного содержания не-предельных жирных кислот, усиливающих адаптивную способность к экстремальным факторам замораживания–высушивания. Рассмотрена и предложена оригинальная трактовка механизма устойчивости мелких микробных клеток, образующихся при температуре ( $21\pm 1$ ) °C вследствие меньшего повреждающего воздействия молекул пара при возгонке в процессе лиофилизации.

*Ключевые слова:* температурный режим, вакцина чумная живая, параметры качества готового препарата, электронная микроскопия, морфология клетки, лиофилизация.

D.A.Budyka, A.I.Bondarenko, A.A.Fisun, N.V.Abzaeva, G.F.Ivanova, S.E.Gostishcheva, S.M.Rudnev

## Qualitative Indicators of Microbial Cells of *Yersinia pestis* EV Strain Depending on Their Morphological Traits in Different Temperature Conditions of Manufacturing of Plague Vaccine Preparation

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol

The preference of the ( $21\pm 1$ ) °C temperature for cultivation of the vaccine strain *Yersinia pestis* EV in the live plague vaccine biomass production to ( $27\pm 1$ ) °C is experimentally confirmed. An original interpretation of the mechanism of small cells stability that are formed at ( $21\pm 1$ ) °C has been proposed. This interpretation stipulates a smaller damaging effect of steam molecules during sublimation in the process of lyophilization.

*Key words:* temperature condition, live plague vaccine, quality parameters of stock-produced preparation, electron microscopy, cell morphology, lyophilization.

В сложном процессе биотехнологии производства вакцины чумной живой температура культивирования микробных клеток вакцинного штамма является одним из рычагов, позволяющих существенно повысить ростовые свойства биомассы и, в конечном итоге, оптимизировать качественные параметры готовой продукции. В настоящее время в нормативной документации на препарат заложен традиционно используемый в течение нескольких десятилетий температурный режим культивирования микробных клеток ( $27\pm 1$ ) °C, а также дополнительно ( $21\pm 1$ ) °C, позволивший получать бактериальное сырье как с исходно более высокими показателями жизнеспособности микробных клеток, так и с наилучшими характеристиками по термо- и ксерорезистентности биомассы [3].

В процессе разработки и внедрения ( $21\pm 1$ ) °C температуры культивирования мы обратили внимание на тот факт, что в ходе бактериоскопического контроля этапов производства на специфическую стерильность клетки чумного микроба *Yersinia pestis* EV были меньших размеров в сравнении с теми, которые выращивали при температуре ( $27\pm 1$ ) °C.

Целью данного сообщения является изучение значения морфометрических показателей клеток вакцины чумной живой для более глубокого понимания процессов, происходящих во время лиофилизации.

### Материалы и методы

Исследовали образцы вакцины, приготовленные из биомасс, выращенных при обеих температурах культивирования. После чего готовили препараты для исследования под электронным микроскопом, фотографировали несколько полей зрения при инструментальном увеличении  $\times 4000$ . Полученные негативы сканировали специальным прибором и в последующем работали с цифровыми копиями.

В качестве изучаемого морфометрического показателя нами был выбран поперечный размер клетки. Это было обусловлено тем, что продольный размер имеет значительную вариабельность из-за постоянного роста и размножения клеток. Замеры поперечного сечения фотокопий клеток проводили с помощью компьютера в миллиметрах. Результаты измерений делили на инструментальное увеличение

микроскопа  $\times 4000$  и определяли истинное значение поперечного сечения клеток.

Статистическую обработку проводили общепринятым методом [5].

### Результаты и обсуждение

Для двух температурных режимов было сделано 44 измерения. В результате поперечный размер клеток, выращенных при температуре  $(21 \pm 1)^\circ\text{C}$ , составил  $(0,67 \pm 0,03)$  мкм, а при  $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$  –  $(0,88 \pm 0,02)$  мкм,  $P < 0,001$ .

Уменьшение размеров клеток, выращенных при более низких температурах, может быть вызвано тем, что изменяется их физиологическая активность. Поскольку по основным параметрам (жизнеспособность, термостабильность) мы отмечали улучшение качества препаратов, полученных при более низкой температуре культивирования микробных клеток, можно предположить, что в этом случае в их мембранных структурах (цитоплазматическая мембрана и мембрана клеточной стенки) липидные слои представлены в большей степени ненасыщенными жирными кислотами. Это, в свою очередь, делает мембраны менее уязвимыми к таким факторам, как замораживание при низких температурах с последующей лиофилизацией. Изложенное подтверждается и литературными данными [1, 4].

При сублимационной сушке происходят мощные газовые потоки, образующие в ампуле с 2 мл суспензии почти 20000 л пара, эвакуация которого через толщу замороженного блока, по образному выражению Б.И.Бланкова и Д.А.Клебанова [2], «бомбардирует» поверхность клеток миллиардами перемещающихся частиц. Такая «бомбардировка» наиболее вредное воздействие оказывает на пограничные системы клеток, которые играют важную роль в жизнеобеспечении микробов. Поэтому уменьшение размеров клеток сказывается положительно при лиофилизации, поскольку такие клетки испытывают меньшее воздействие молекул пара.

Воздействие пара на клетки показано на рисунке, из которого следует, что при уменьшении объема клеток уменьшается и площадь, на которую воздействуют потоки пара. Другая положительная сторона уменьшения размеров клеток заключается в том, что при прочих равных условиях и одинаковых концентрациях клеткам с меньшими размерами будет не так «тесно» в контейнере, в сравнении с более крупными в момент механического воздействия кристаллов льда, образующихся при замерзании.

Несмотря на то, что температура культивирования  $(21 \pm 1)^\circ\text{C}$  микробных клеток штамма EV не является традиционно оптимальной и приводит к уменьшению размера клеток, данная биомасса характеризуется более высокими показателями жизнеспособности и лучше переживает процессы замораживания и лиофилизации, в сравнении с  $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$  культурами.

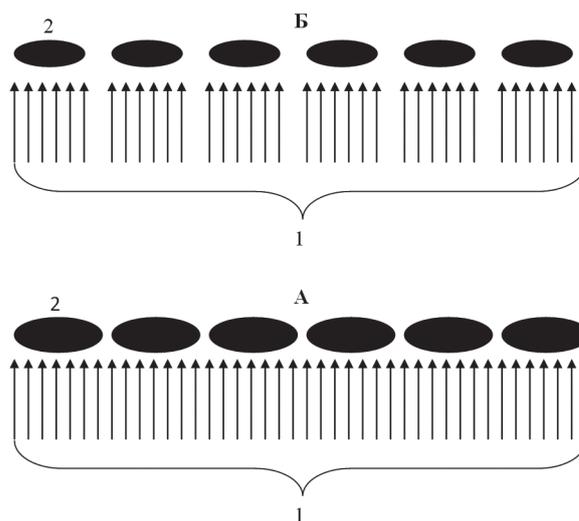


Схема воздействия пара (1) на клетки (2) при их обычных (А) и при уменьшенных размерах (Б)

Так, исходная жизнеспособность  $(21 \pm 1)^\circ\text{C}$  серий вакцины составила в среднем  $(47,1 \pm 3,7)\%$ , во время как в сериях  $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$  регистрировался показатель в  $(30,7 \pm 2,8)\%$ . А термостабильность препарата соответственно была  $(12,4 \pm 0,92)$  и  $(10,8 \pm 0,1)$  сут.

По истечении 3 лет показатель жизнеспособности микробов в ампуле  $(21 \pm 1)^\circ\text{C}$  составил  $(34,3 \pm 3,4)\%$ , что существенно превосходит регламентированный (25 %). Наибольшее снижение жизнеспособности зарегистрировано у  $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$  образцов –  $(18,0 \pm 2,2)\%$ .

По данным электронной микроскопии, процент поврежденных клеток в вакцинных препаратах из  $(21 \pm 1)$  и  $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$  составил соответственно  $(4 \pm 0,2)$  и  $(7,5 \pm 0,6)$ .

Таким образом, снижение температуры культивирования биомассы чумного вакцинного штамма EV в биотехнологии препарата вакцины чумной живой с  $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$  до  $(21 \pm 1)^\circ\text{C}$  обеспечивает более высокие кондиции конечного продукта не только вследствие оптимизации биохимических механизмов, препятствующих повреждающему воздействию факторов замораживания-высушивания, но и, очевидно, более подходящих морфологических параметров микробных клеток, имея в виду уменьшение физического воздействия на менее крупные клеточные корпускулы в процессе возгонки молекул пара при лиофилизации.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алутин И.М., Домарадский И.В., Суичмезова А.В. Изучение динамики размножения некоторых видов микроорганизмов с помощью политермостата. Пробл. особо опасных инф. 1973; 1(29):182–9.
2. Бланков Б.И., Клебанов Д.А. Применение лиофилизации в микробиологии. М.: Медгиз, 1961. С. 209–11.
3. Будыка Д.А., Абзаева Н.В., Иванова Г.Ф., Фисун А.А., Ляпустина Л.В. Сравнительный анализ экспериментальных серий вакцины чумной живой по показателям жизнеспособности и термостабильности. Пробл. особо опасных инф. 2009; 4(102):68–71.
4. Еременко Ю.Д., Бывалов А.А., Пименов Е.В. Особенности жирно-кислотного состава клеток *Yersinia pseudotuberculosis*, выращенных на плотной питательной среде при различных тем-

пературах. Пробл. особо опасных инф. 2005; (89):41–3.

5. *Oivin I.A.* Статистическая обработка результатов экспериментальных исследований. Патол. физиол. 1960; 4:76–85.

**References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)**

1. *Alutin I.M., Domaradsky I.V., Suichmezova A.V.* [Study of the propagation dynamics in some species of microorganisms using polythermostat]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 1973; 29:182–9.

2. *Blankov B.I., Klebanov D.A.* [Application of the Lyophilization in Microbiology]. М.: Medgiz; 1961. P. 209–11.

3. *Budyka D.A., Abzaeva N.V., Ivanova G.F., Fisun A.A., Lyapustina L.V.* [Comparative analysis of experimental series of plague live vaccine as for viability and thermostability indices]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2009; 102:68–71.

4. *Eremenko Yu.D., Vyvalov A.A., Pimenov E.V.* [Peculiarities of fatty-acid composition of *Yersinia pseudotuberculosis* cells grown on solid nutritional medium at different temperatures]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.*

2005; 89:41–3

5. *Oivin I.A.* [Statistical processing of results from experimental investigations]. *Patol. Phisiol.* 1960; 4:76–85.

**Authors:**

*Budyka D.A., Bondarenko A.I., Fisun A.A., Abzaeva N.V., Ivanova G.F., Gostishcheva S.E., Rudnev S.M.* Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russia. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

**Об авторах:**

*Будыка Д.А., Бондаренко А.И., Фисун А.А., Абзаева Н.В., Иванова Г.Ф., Гостищева С.Е., Руднев С.М.* Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Поступила 17.05.12.