

Оригинальное исследование  
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-304>



## Способность к вегетированию и спорообразованию штаммов *Bacillus anthracis* с различными фенотипическими свойствами в условиях, имитирующих почву

Котенева Е.А.<sup>1,2✉</sup>, Цыганкова О.И.<sup>1</sup>, Калинин А.В.<sup>1</sup>, Абрамович А.В.<sup>1</sup>, Щербакова В.Ю.<sup>1</sup>, Родионов И.С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия;

<sup>2</sup>Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь, Россия

### Аннотация

**Введение.** Изучение способности штаммов *Bacillus anthracis* с различающимися фенотипическими свойствами к герминации спор, размножению и спорообразованию на среде, основой которой является водный экстракт почвы, может способствовать оценке значимости этих процессов в формировании и поддержании почвенных очагов сибирской язвы.

**Цель** работы — анализ индивидуальных особенностей развития вегетативной культуры штаммов возбудителя сибирской язвы с различным фенотипом на модели почвенной среды.

**Материалы и методы.** На группе штаммов сибиреязвенного микроба, имеющих разный плазмидный состав и вирулентность, исследована возможность прорастания спор, размножения бацилл и, по крайней мере у некоторых из них, продуктивное спорообразование на почвенной среде.

**Результаты.** Выявлены три варианта развития культуры штаммов *B. anthracis*: 1 — споры остаются интактными, не прорастая; 2 — после герминации спор формируются бациллы, которые с различной интенсивностью размножаются, переходя в инволюционные формы без образования спор; 3 — прохождение полного физиологического цикла «спора–бацилла–спора». Наличие 2% крови в почвенной среде способствовало прорастанию спор и размножению культуры, но тормозило процесс спорообразования в период наблюдения — 3 сут. Не выявлено корреляции между определённым фенотипом изученных штаммов *B. anthracis* и способностью к прорастанию и вегетации на почвенных средах.

**Обсуждение.** Полученные данные о том, что только 1–7% КОЕ даёт начало формированию колоний на почвенной среде, позволяют предположить неоднородность свойств популяции использованных штаммов. Выделение таких культур и их дальнейшее подробное изучение позволит выявить наиболее значимые для осуществления полного физиологического цикла в условиях, имитирующих почву, комплексы биологических свойств.

**Ключевые слова:** сибирская язва, штаммы *Bacillus anthracis*, почвенная среда, фенотипические свойства, герминация спор, спорообразование

**Источник финансирования.** Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Для цитирования:** Котенева Е.А., Цыганкова О.И., Калинин А.В., Абрамович А.В., Щербакова В.Ю., Родионов И.С. Способность к вегетированию и спорообразованию штаммов *Bacillus anthracis* с различными фенотипическими свойствами в условиях, имитирующих почву. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(3):186–193.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-304>

EDN: <https://www.elibrary.ru/ovreep>

# Ability for vegetation and spore formation of *Bacillus anthracis* strains with different phenotypical properties under soil simulating conditions

Elena A. Koteneva<sup>1,2</sup>, Olga I. Tsygankova<sup>1</sup>, Aleksander V. Kalinin<sup>1</sup>,  
Alena V. Abramovich<sup>1</sup>, Victoriya Yu. Shcherbakova<sup>1</sup>, Ivan S. Rodionov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Stavropol Research Antiplague Institute, Stavropol, Russia;

<sup>2</sup>North Caucasian Federal University, Stavropol, Russia

## Abstract

**Introduction.** The study of the ability of *Bacillus anthracis* strains with different phenotypic properties to spore germination, reproduction and sporulation on a medium based on an aqueous soil extract can help assess the significance of these processes in the formation and maintenance of soil anthrax foci.

**Aim.** The analysis of individual characteristics of the development of a vegetative culture of anthrax pathogen strains with different phenotypes in a soil medium model.

**Materials and methods.** On a group of anthrax microbe strains with different plasmid composition and virulence, the possibility of spore germination, reproduction of bacilli and, at least in some of them, productive spore formation on the soil medium was studied.

**Results.** Three variants of culture development of *B. anthracis* strains were identified: 1 — spores remain intact, not germinating; 2 — after germination of spores, bacilli are formed, which multiply with different intensity, passing into involutinal forms without spore formation; 3 — the passage of a complete physiological cycle "spore–bacillus–spore". The presence of 2% blood in the soil environment contributed to the germination of spores and reproduction of the culture, but inhibited the process of sporulation during the observation period of 3 days. No correlation was found between a certain phenotype of the studied strains of *B. anthracis* and the ability to germinate and vegetate on soil media.

**Conclusion.** The data obtained that only 1–7% of CFU gives rise to the formation of colonies on the soil medium suggest the heterogeneity of the properties of the population of the studied strains. Isolation of such cultures and their further detailed study will make it possible to identify the most significant complexes of biological properties for the realization of a complete physiological cycle under soil-simulating conditions.

**Keywords:** anthrax, *Bacillus anthracis* strains, soil environment, phenotypic properties, spore germination, spore formation

**Funding source.** This study was not supported by any external sources of funding.

**Conflict of interest.** The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**For citation:** Koteneva E.A., Tsygankova O.I., Kalinin A.V., Abramovich A.V., Shcherbakova V.Yu., Rodionov I.S. Ability for vegetation and spore formation of *Bacillus anthracis* strains with different phenotypical properties under soil simulating conditions. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023;100(3):186–193. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-304> EDN: <https://www.elibrary.ru/ovreep>

## Введение

Возбудитель сибирской язвы — *Bacillus anthracis* — является патогенным для большого количества видов животных и человека и обладает комплексом приспособительных механизмов для активного размножения в организме млекопитающих и сохранению бацилл в почве. Непродолжительная фаза существования в организме чувствительных животных подчинена цели быстрого и продуктивного размножения бацилл. В отличие от людей, болеющих в основном локализованной кожной формой, у чувствительных к данной инфекции животных наблюдается генерализованная

форма заболевания, результатом которой является их гибель. В этом случае в предагональном периоде в биоматериале достигается очень высокая концентрация бацилл, прошедших отбор по признаку вирулентности. В естественных условиях (при отсутствии специальных мер человека) на протяжении длительного процесса эволюции сибирезвенного микроба бациллы вместе с трупом и биологическими жидкостями попадали в почву, где происходил процесс формирования спор, обеспечивающий при определённых почвенно-климатических условиях их длительное сохранение [1, 2]. Учитывая, что в процессе вынужденной прирезки больных живот-

ных на почву попадает значительный объём крови, которая является прекрасной питательной средой, обеспечивающей размножение бацилл даже в виде незначительной добавки к различным субстратам (почве), можно предположить, что такие участки почвы способны стать микроочагами размножения бацилл и при определённых условиях накапливать споры. Несмотря на то что общепризнанной основной функцией почвенной фазы существования *B. anthracis* является длительное сохранение микроба в виде спор, в научной литературе активно обсуждается вопрос и о возможности вегетирования сибиреязвенного микроба в почве, впервые поднятый в работе [3]. Подтверждением существования вегетативной фазы в почве может служить тот факт, что в определённых условиях *B. anthracis* может расти *in vitro* в виде биоплёнки [4], которая является предпочтительным состоянием для микроорганизмов в окружающей среде. Е. Saile и соавт. показали, что в модели системы ризосферы *B. anthracis* растёт как сапрофит [6]. В свете этих данных необходимо отметить, что сибиреязвенный микроб находится в близком генетическом родстве с группой очень успешных почвенных микроорганизмов — *B. cereus sensu lato* [6]. С учётом длительности «почвенной» фазы существования *B. anthracis* и ее важности в формировании резервуара инфекции очевидна необходимость изучения всех факторов и процессов, оказывающих воздействие на микроба в этой сложной и многофакторной экологической системе.

**Цель работы** — анализ индивидуальных особенностей развития вегетативной культуры штаммов возбудителя сибирской язвы с различным фенотипом на модели почвенной среды.

## Материалы и методы

В работе использовали штаммы *B. anthracis*: диплоидные 1(CO), 12/16, 14/41, 12/16-1 4P, 228, 228 прот (с классическим капсулообразованием), 1(CO)-S, 1(CO)-5-1 SM, 14/41-1a SM и 12/16-S (формирующую капсулу в атмосфере воздуха); а также акапсульные моноплазмидные 228/8, 14/41 Trp<sup>+</sup> (pXO1<sup>+</sup>, pXO2<sup>-</sup>) и бесплазмидный 228/4. Среди исследованных штаммов были различающиеся по токсино- и капсулообразованию, протеолитической, гемолитической и лецитиназной активности, а также по принадлежности к основным генетическим группам А и В (таблица). Перечисленные свойства были изучены в соответствии с данными [3]. Штаммы *B. anthracis* были получены из лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов» Ставропольского противочумного института Роспотребнадзора. Вся работа с культурами штаммов *B. anthracis* проводилась с соблюдением требований СанПин 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»). Споры для проведения эксперимента

получали в соответствии с МУК 4.2.2413–08 «Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы» на агаре Гладстона. После смыывания спор со среды дистиллированной водой (ДВ) и отстаивания взвеси в холодильнике в течение 3–4 сут жидкость удаляли, а из осадка спор делали мазки и окрашивали методом Ребигера для контроля наличия бактериального дебриса и единичных вегетативных клеток. Для очистки спор от указанных примесей применяли процедуру последовательной отмывки спор в ДВ с промежуточным контролем в окрашенных мазках из осадка. Убедившись, что взвесь спор не содержит вегетативной культуры и дебриса, из неё готовили взвесь  $1 \times 10^3$  КОЕ/мл, которую использовали для засева питательных сред.

Основой почвенной среды служил водный экстракт почвы, который получали, заливая пробу почвы стерильной ДВ в соотношении 1 : 1 (по объёму). После тщательного перемешивания отстаивали для осаждения грубых частиц, измеряли рН (7,2) надосадочной жидкости, добавляли агар до концентрации 1,5%, стерилизовали и разливали в чашки Петри. В часть приготовленной почвенной среды после охлаждения до 45°C добавляли 2% крови человека, после чего разливали в чашки Петри.

Посев спор производили в дозе  $1 \times 10^2$  КОЕ в объёме 100 мкл, распределяли шпателем по поверхности среды и инкубировали в термостате в атмосфере воздуха при 37°C. Результаты оценивали визуально по наличию роста и просмотром мазков, окрашенных методом Ребигера. В качестве контроля использовали аналогичные посевы на LB-агар, ВН-агар и почвенный агар с добавлением 2% гепаринизированной крови.

## Результаты

Уже через 24 ч на всех контрольных средах наблюдался рост, соответствующий посевной дозе. В окрашенных мазках из культур с LB-агара и ВН-агара наблюдались типичные для *B. anthracis* интенсивно окрашенные бациллы, расположенные цепочками, многие из которых содержали внутриклеточно формирующиеся споры (рис. 1, а, б). В мазках культур с почвенно-кровяного агара наблюдалась типичная морфология бацилл в виде цепочек (рис. 1, в).

Они не формировали споры за исключением штаммов *B. anthracis* 228/8 (рис. 2, а) и 14/41 (рис. 2, б), у которых очень небольшое количество клеток начинали формировать споры. Кроме того, на почвенно-кровяной среде выделялся штамм 1(CO)-S с атипичным капсулообразованием, бациллы которого в этих условиях формировали капсулу (рис. 2, в), которая выявлялась и через 3 сут после посева (рис. 2, г).

В посевах на почвенной среде штаммы *B. anthracis* различались по способности спор про-

Фенотипические и генетические характеристики штаммов *B. anthracis*, использованных в работе  
 Phenotypic and genetic characteristics of *B. anthracis* strains used in the study

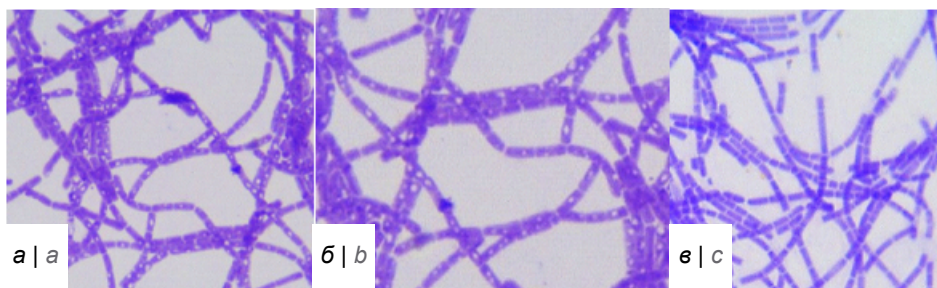
Наименование штаммов <i>B. anthracis</i> и их субкультур Name of <i>B. anthracis</i> strains and their subcultures	Источник выделения Selection source	Признак выделения Feature of selection	Фенотип Phenotype	Генетическая группа Genetic group	Плазмидный состав Plasmid composition	Категория вирулентности <i>in vitro</i> [12] Virulence category <i>in vitro</i> [12]
1CO	Кровь КРС Blood of cattle	Принадлежность к <i>B. anthracis</i> Belonging to <i>B. anthracis</i>	Cap(CO <sub>2</sub> ) <sup>+</sup> (O <sub>2</sub> ) <sup>-</sup> Tox <sup>+</sup> ProtA <sup>+</sup> Hly <sup>+</sup> Lec <sup>-</sup> Trp <sup>+</sup>	A	pXO1 <sup>+</sup> pXO2 <sup>+</sup>	Высоковирулентные Highly virulent
228 прот	Штамм 228 Strain 228	Независимость от Trp Independence from Trp				
12/16-1 4P	Штамм 12/16-1 Strain 12/16-1	После 4 пассажей** After 4 passages**				
228	Производственный штамм Manufacturing strain	Принадлежность к <i>B. anthracis</i> Belonging to <i>B. anthracis</i>	Cap(CO <sub>2</sub> ) <sup>+</sup> (O <sub>2</sub> ) <sup>-</sup> Tox <sup>-</sup> ProtA <sup>-</sup> Hly <sup>-</sup> Lec <sup>-</sup> Trp <sup>-</sup>	B		Умеренно вирулентные Moderately virulent
12/16	Отделяемое язвы Ulcer discharge					
14/41	Отделяемое язвы Ulcer discharge					
1CO-S	Штамм 1CO Strain 1CO	Cap <sup>+</sup> (O <sub>2</sub> )	Cap(CO <sub>2</sub> ) <sup>+</sup> (O <sub>2</sub> ) <sup>+</sup> Tox <sup>-</sup> ProtA <sup>-</sup> Hly <sup>-</sup> Lec <sup>-</sup> Trp <sup>-</sup>			Слабовирулентные Weakly virulent
12/16-S	Штамм 12/16 Strain 12/16					
1 CO-5-1 SM	Штамм 1CO-S Strain 1CO-S					
14/41-1a SM	Штамм 14/41-1 Strain 14/41-1					
228/8	Штамм 228 Strain 228	Вакцинный штамм Vaccine strain	Cap <sup>-</sup> Tox <sup>+</sup> ProtA <sup>-</sup> Hly <sup>-</sup> Lec <sup>-</sup> Trp <sup>+</sup>		pXO1 <sup>+</sup> pXO2 <sup>-</sup>	Авирулентные Avirulent
14/41 Trp <sup>+</sup>	Штамм 14-41 Strain 14-41	Независимость от Trp Independence from Trp	Cap <sup>-</sup> Tox <sup>+</sup> ProtA <sup>-</sup> Hly <sup>-</sup> Lec <sup>+</sup> Trp <sup>+</sup>			
228/4	Штамм 228 Strain 228	Отсутствие капсулообразования Absent capsule formation	Cap <sup>-</sup> Tox <sup>-</sup> ProtA <sup>-</sup> Hly <sup>-</sup> Lec <sup>-</sup> Trp <sup>-</sup>	B	pXO1 <sup>-</sup> pXO2 <sup>-</sup>	Апатогенные Apathogenic

**Примечание.** <sup>+</sup>Наличие признака; <sup>-</sup>отсутствие признака; \*признак не определен в связи с отсутствием роста. Cap(CO<sub>2</sub>) — способность к образованию капсулы в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>; Cap(O<sub>2</sub>) — способность к образованию капсулы в атмосфере воздуха. Hly — способность лизировать отмытые эритроциты барана. Lec — фосфолипазная активность на плотной среде с яичным желтком. Trp — прототрофность по триптофану. Tox — формирование линий иммунопреципитации с противосибиреязвенным гамма-глобулином на среде СОПЭК.

\*\*Данный штамм был выделен из популяции акапсульного штамма 12/16-1 путём последовательных 4 пассажей на беспородных белых мышах (при заражении культурой, полученной на предыдущем пассаже) и отличался от исходного по фенотипу, плазмидному составу и генотипу.

**Note.** <sup>+</sup>Presence of a trait; <sup>-</sup>absence of a trait; \*trait not defined due to lack of growth. Cap(CO<sub>2</sub>) — ability to form a capsule in an atmosphere with 5% carbon dioxide; Cap(O<sub>2</sub>) — the ability to form a capsule in an air atmosphere. Hly — ability to lyse washed sheep erythrocytes. Lec — phospholipase activity on solid medium with egg yolk. Trp — tryptophan prototrophy. Tox — formation of immunoprecipitation lines with anti-anthrax gammaglobulin on SOPEK medium.

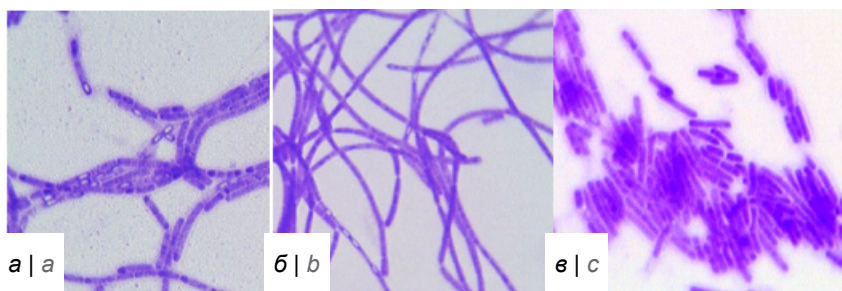
\*\*This strain was isolated from the population of the capsular strain 12/16-1 by 4 consecutive passages on outbred white mice (when infected with the culture obtained at the previous passage) and differed from the initial one in phenotype, plasmid composition and genotype.



**Рис. 1.** Микрофотография окрашенных мазков суточной культуры штамма *B. anthracis* 1(CO) с LB-агара (а), ВН-агара (б) и почвенно-кровяного агара (в).

Окраска методом Ребигера,  $\times 500$ .  
**Fig. 1.** Micrograph of stained smears of daily culture of *B. anthracis* 1(CO) strain from LB-agar (a), BH-agar (b), and soil-blood agar (c).

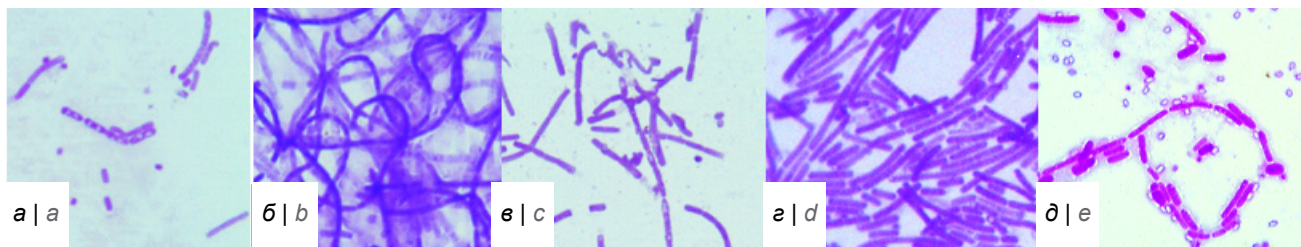
Rebiger staining,  $\times 500$ .



**Рис. 2.** Микрофотография окрашенных мазков суточной культуры штаммов *B. anthracis* 228/8 (а), 14/41 (б) и 1(CO)-S (в) и 3-суточной (г) с почвенно-кровяного агара.

Окраска методом Ребигера,  $\times 500$ .  
**Fig. 2.** Micrograph of stained smears of a daily culture of *B. anthracis* strains 228/8 (a), 14/41 (b), and 1(CO)-S (c) and a 3-day-old (d) from soil-blood agar.

Rebiger staining,  $\times 500$ .



**Рис. 3.** Микрофотография окрашенных мазков 3-суточных культур штамма *B. anthracis* 1(CO) с почвенного агара (а) и почвенно-кровяного агара (б), штамма *B. anthracis* 228/4 с почвенного агара (в) и с почвенно-кровяного агара (г), штамма *B. anthracis* 228/8 с почвенно-кровяного агара (д).

Окраска методом Ребигера,  $\times 500$ .

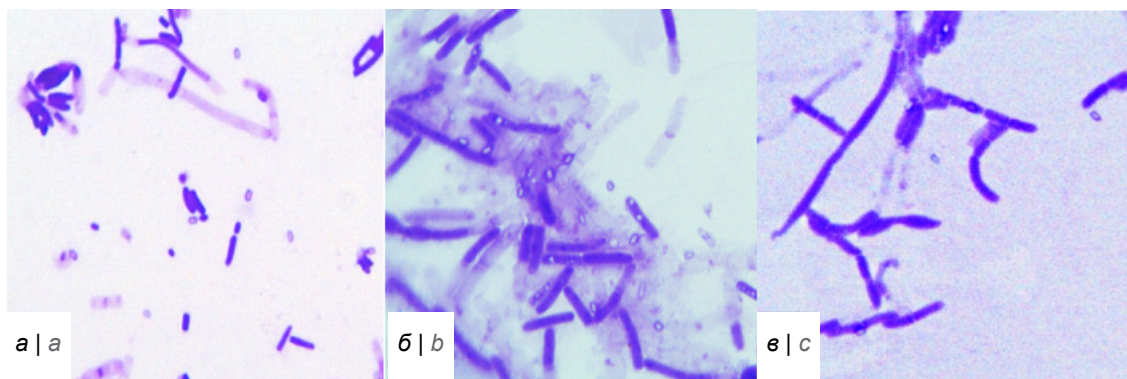
**Fig. 3.** Micrograph of stained smears of 3-day cultures of *B. anthracis* 1(CO) strain from soil agar (a) and soil-blood agar (b) and strain 228/4 from soil agar (c) and soil-blood agar (d), 228/8 from soil-blood agar.

Rebiger staining,  $\times 500$ .

растать и формировать колонии на этой среде, а также образовывать споры. В первую очередь следует отметить, что по сравнению с контрольными средами рост на почвенной среде был очень скудным, штаммы формировали не более 1–7 колоний. Через 24 ч рост наблюдался только у штамма 1(CO), через 48 ч — у штаммов 1(CO)-5-1 SM, 228/4 и 228/8, а через 72 ч добавился рост штаммов 14/41, 14/41 Trp<sup>+</sup>, 1(CO)-S и 228. Штамм 12/16 и его произво-

дные 12/16-S и 12/16 1 4P, а также штаммы 14/41-1a SM и 228 прот не дали видимого роста в течение всего срока наблюдения (6 сут).

В окрашенных мазках 3-суточной культуры штамма *B. anthracis* 1(CO) (рис. 3, а), первым сформировавшего колонии на почвенном агаре, наблюдалось не только активное формирование внутриклеточных спор, но и значительное количество расположенных внеклеточно, часть

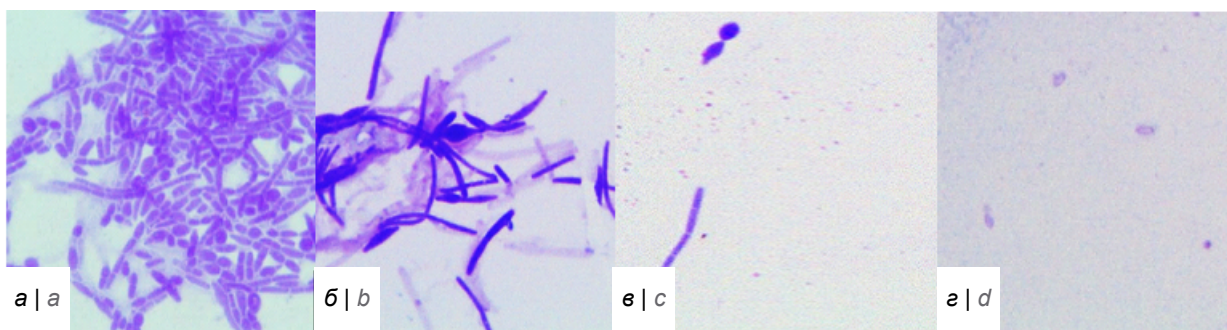


**Рис. 4.** Микрофотография мазка культуры штаммов *B. anthracis* 1(CO) (а), 14/41 (б) и 228/4 (в) с почвенной среды (6 сут).

Окраска методом Ребигера,  $\times 500$ .

**Fig. 4.** Micrograph of a culture smear of *B. anthracis* strains 1(CO) (a), 14/41 (b) and 228/4 (c) from the soil medium (6 days).

Rebigier staining,  $\times 500$ .



**Рис. 5.** Микрофотография мазка культуры штаммов *B. anthracis* 228 (а), 1(CO)-S (б), 228 прот (в) и 14/41-1а SM (г) с почвенной среды (6 сут).

Окраска методом Ребигера,  $\times 500$ .

**Fig. 5.** Micrograph of a culture smear of *B. anthracis* strains 228 (a), 1(CO)-S (b), 228 prot (c) and 14/41-1a SM (d) from the soil medium (6 days).

Rebigier staining,  $\times 500$ .

из которых интенсивно прокрашены, возможно, вследствие начала герминации. В этот же срок на почвенно-кровяной среде образование спор не отмечалось, несмотря на то что значительная часть бацилл находилась в стадии лизиса (деградации) (рис. 3, б). Похожая картина наблюдалась и в мазках штамма 228/4 (рис. 3, в, г). Исключение составил штамм 228/8, в мазках из 3-суточной культуры которого наблюдалось большое количество свободных спор (рис. 3, д).

По состоянию культуры на момент завершения эксперимента (6 сут) исследуемые штаммы *B. anthracis* можно разделить на несколько групп. Первую группу составляли штаммы *B. anthracis* 1(CO), 14/41 и 228/4 (рис. 4), в мазках у которых в эти сроки наблюдалось значительное количество вегетативной культуры, вероятно в различных физиологических фазах — интенсивно прокрашенные, с чёткими контурами бациллы и бледные «раздутые», нечётко контурированные клетки в виде теней. Встречались бациллы с изменённой формой (булавовидные и бочкообразные), увеличенные в

размерах. В значительном количестве встречались расположенные внеклеточно споры.

Культура штаммов *B. anthracis* 228, 1(CO)-S была представлена в основном изменёнными по форме и величине бациллами при отсутствии спор (рис. 5, а, б). При смыве минимальным количеством ДВ (0,05 мл) с поверхности почвенного агара после 6 сут инкубации штаммов *B. anthracis* 12/6 и 228 прот (рис. 5, в), которые не формировали видимых колоний, в мазках выявляли единичные бациллы, в том числе с изменённой морфологией. В мазке из смыва с почвенного агара, засеянного спорами штамма *B. anthracis* 14/41-1а SM, были обнаружены в небольшом количестве только неизменённые споры при полном отсутствии вегетативной формы (рис. 5, г), что свидетельствует об отсутствии условий для их прорастания.

### Обсуждение

В результате проведённых экспериментов была выявлена способность спор большинства использованных штаммов *B. anthracis* проходить

стадию герминации с последующим формированием вегетативной культуры, а у части культур и последующее образование спор на питательной среде, основой которой является экстракт почвы. Добавление в такую агаризованную среду 2% гепаринизированной крови обеспечивало прорастание спор и формирование колоний у всех изученных в данной работе штаммов после инкубации в течение 1 сут. Влияние наличия крови в почвенной среде на эффективное спорообразование, очевидно, неодинаково у различных штаммов сибиреязвенного микроба. Так, после суточной инкубации на почвенно-кровяном агаре единичные бациллы в стадии спорообразования наблюдались в мазках только двух из исследованных штаммов — 228/8 и 14/41, а значительное количество внеклеточно расположенных спор наблюдалось только у штамма *B. anthracis* 228/8 через 3 сут. Отсутствие спорообразования на почвенно-кровяной среде в течение 3 сут у большинства использованных в работе штаммов *B. anthracis* подтверждает ингибирующее влияние крови на процесс образования спор [7]. Следует отметить, что в дальнейшем разложение белков крови почвенными бактериями, изменение влажности и температурного режима могут создать более благоприятные условия для спорообразования у большего количества штаммов.

Инкубирование посевов спор на почвенном агаре выявило возможность прохождения полного физиологического цикла развития культуры *B. anthracis* (спора–вегетативные клетки–споры) со значительным накоплением бактериальной массы, а затем и спор, пригодных для дальнейшего длительного сохранения или вступления в следующий физиологический цикл. Такие штаммы, вероятно, способны поддерживать эпизоотологическую значимость почвенных очагов сибирской язвы при определённых почвенно-климатических условиях. Споры большинства использованных в работе штаммов прорастали, образуя вегетативную культуру с различной степенью интенсивности размножения (от образования визуально различных колоний до прорастания спор с образованием одиночных-парных бацилл без интенсивного размножения). Через 6 сут в окрашенных мазках из колоний и смывах с поверхности среды таких штаммов вне зависимости от количества вегетативной культуры, только в некоторых из них встречались единичные во всём препарате споры (от 1 до 5) или вовсе отсутствовали, несмотря на то что культуры уже находились в стадии деградации в виде инволюционных форм — шарообразные и веретенообразные бациллы и их раздутые бледные тени. Такие штаммы вряд ли способны воспроизводить и тем более наращивать потенциал очага. Споры некоторых штаммов не способны прорасти в условиях данного опыта.

Анализ фенотипических свойств штаммов из различных групп по способности размножаться и формировать споры на почвенном агаре не позволил на данном этапе выявить корреляцию между этими параметрами. Так, штаммы *B. anthracis* 1(CO), 14/41 и 228/4, которые не только демонстрировали рост в виде колоний, но и формировали зрелые споры, т.е. теоретически были наиболее перспективными для поддержания «почвенной популяции», различались по принадлежности к основным генетическим группам А или В, плазмидному составу, токсино- и капсулообразованию, протеолитической активности и наличию дополнительных питательных потребностей в триптофане (таблица). Следует, однако, учитывать, что указанные в таблице свойства характеризуют использованные штаммы в целом. В то же время при посевной дозе  $1 \times 10^2$  КОЕ штаммы *B. anthracis* 1(CO), 1(CO) S, 1(CO)-5-1 SM, 228, 228/4, 228/8, 14/41, 14/41 Grp<sup>+</sup> формировали 1–7 колоний, что свидетельствует о возможности неоднородности популяции изученных штаммов и делает возможным присутствие отдельных клеток с фенотипом, отличающимся от подавляющего большинства популяции каждого штамма. Исходя из этого важным для оценки значения вегетирования сибиреязвенных бацилл в условиях, приближенных к почве, является характеристика свойств культур, непосредственно способных к росту на почвенной среде. Всё это делает актуальным выделение таких культур и изучение их фенотипических свойств, генетических характеристик и особенностей экспрессии различных генов.

Актуальным представляется изучение влияния свойств различных типов почв и цикличности параметров температуры и влажности в условиях эксперимента на способность осуществлять полный цикл морфофункционального развития культур возбудителя сибирской язвы с различными свойствами.

#### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Dragon D.C., Rennie R.P. The ecology of anthrax spores: tough but not invincible. *Can. Vet. J.* 1995;36(5):295–301.
2. Dragon D.C., Bader D.E., Mitchell J., Woollen N. Natural dissemination of *Bacillus anthracis* spores in northern Canada. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005;71(3):1610–5. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.71.3.1610-1615.2005>
3. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., ред. *Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство*. М.; 2013. Onishchenko G.G., Kutayev V.V., eds. *Laboratory Diagnostics of Dangerous Infectious Diseases. Practical Guide*. Moscow; 2013.
4. Van Ness G.B. Ecology of anthrax. *Science*. 1971;172(3990):1303–7. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.172.3990.1303>
5. Lee K., Costerton J.W., Ravel J., et al. Phenotypic and functional characterization of *Bacillus anthracis* biofilms. *Microbiology (Reading)*. 2007;153(Pt. 6):1693–701. DOI: <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/003376-0>
6. Saile E., Koehler T.M. *Bacillus anthracis* multiplication, persistence, and genetic exchange in the rhizosphere of grass

plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006;72(5):3168–74.

DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.72.5.3168-3174.2006>

7. Онищенко Г.Г., ред. *Сибирская язва: актуальные проблемы и внедрения медицинских средств защиты*. СПб.; 2018.

#### Информация об авторах

**Котенева Елена Анатольевна**<sup>✉</sup> — к.б.н., зав. лаб. постгеномных технологий Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия; доцент каф. общей биологии и биоразнообразия Северо-Кавказского федерального университета, Ставрополь, Россия, [postgenom\\_stv@mail.ru](mailto:postgenom_stv@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0003-4525-1594>

**Цыганкова Ольга Ивановна** — д.м.н., врач-бактериолог лаб. бруцеллеза Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7940-9460>

**Калинин Александр Васильевич** — биолог лаб. постгеномных технологий Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2678-2624>

**Абрамович Елена Владимировна** — м.н.с. лаб. постгеномных технологий Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8852-4332>

**ЩербакOVA Виктория Юрьевна** — лаборант-исследователь лаб. постгеномных технологий Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2982-4877>.

**Родионов Иван Сергеевич** — м.н.с. лаб. постгеномных технологий Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0049-7411>

**Участие авторов.** Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 30.12.2022;  
принята к публикации 01.03.2023;  
опубликована 28.06.2023

Onishchenko G.G., ed. *Anthrax: Current Problems and the Introduction of Medical Means of Protection*. St. Petersburg; 2018.

#### Information about the authors

**Elena A. Koteneva**<sup>✉</sup> — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of postgenomic investigations, Stavropol Research Antiplague Institute, Stavropol, Russia; Associate Professor, Department of general biology and biodiversity, North Caucasian Federal University, Stavropol, Russia, [postgenom\\_stv@mail.ru](mailto:postgenom_stv@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0003-4525-1594>

**Olga I. Tsygankova** — D. Sci. (Med.), bacteriologist, Brucellosis laboratory, Stavropol Research Antiplague Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7940-9460>

**Aleksander V. Kalinin** — biologist, Laboratory of postgenomic investigations, Stavropol Research Antiplague Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2678-2624>

**Alena V. Abramovich** — junior researcher, Laboratory of postgenomic investigations, Stavropol Research Antiplague Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8852-4332>.

**Victoriya Yu. Shcherbakova** — assistant, Laboratory of postgenomic investigations, Stavropol Research Antiplague Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2982-4877>

**Ivan S. Rodionov** — junior researcher, Laboratory of postgenomic investigations, Stavropol Research Antiplague Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0049-7411>.

**Author contribution.** All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 30.12.2022;  
accepted for publication 01.03.2023;  
published 28.06.2023