



Отработка режима низкотемпературной консервации штаммов *Bacillus anthracis*

А. П. Родионов, Е. А. Артемьева, Л. А. Мельникова, Д. М. Сахибуллина

ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»), г. Казань, Республика Татарстан, Россия

РЕЗЮМЕ

Ключевой проблемой использования чистых культур микроорганизмов является их хранение, транспортировка, восстановление жизнеспособности после длительной консервации с сохранением ценных биологических свойств. Применяемые в настоящее время противосибирезвенные вакцины создаются с использованием различных штаммов *Bacillus anthracis*. На сегодняшний день штаммы возбудителя сибирской язвы, согласно данным паспортов, консервируют в 30–40-процентных растворах глицерина, позволяющих сохранять достаточное количество жизнеспособных клеток, а также свойства возбудителя в течение трех лет. Очевидно, что разработка способа консервации штаммов *Bacillus anthracis* для более продолжительного хранения возбудителя является актуальной задачей. Целью работы было отработать режим низкотемпературной консервации штаммов *Bacillus anthracis*, обеспечивающий сохранность жизнеспособности и биологических свойств возбудителя. Для проведения исследований были отобраны два вакцинных штамма *Bacillus anthracis*: К-СТИ-79 и 55-ВНИИВВИМ, а также две криопротекторные среды: № 1 – 15%-й раствор глицерина с 15%-м раствором глюкозы и № 2 – 30%-й нейтральный раствор глицерина на физиологическом растворе. На первом этапе были изучены биологические свойства штаммов и подсчитано количество жизнеспособных клеток. После чего штаммы были помещены на низкотемпературную консервацию при минус 40 и минус 70 °С. Через 6 месяцев хранения изучали сохранность их жизнеспособности и биологических свойств при трех режимах разморозки: при комнатной температуре (22 ± 2) °С, на водяной бане при температуре (37 ± 1) °С и в бытовом холодильнике при температуре (6 ± 2) °С. Было установлено, что наиболее подходящим режимом явилось хранение клеток при минус 70 °С и размораживание на водяной бане при (37 ± 1) °С. Дальнейшие исследования будут направлены на установление максимально возможной длительности хранения штаммов при низкотемпературном режиме консервации, при которой сохраняются жизнеспособность и биологические свойства возбудителя.

Ключевые слова: сибирская язва, *Bacillus anthracis*, штаммы, низкотемпературная консервация

Благодарность: Работа выполнена за счет средств ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» в рамках научно-исследовательской работы по теме «Коллекционирование, поддержание, пополнение и хранение штаммов возбудителей особо опасных болезней (ООБ), организация их учета, проведение исследований по изучению биологических свойств и обеспечение предприятий агропромышленного комплекса штаммами возбудителей ООБ».

Для цитирования: Родионов А. П., Артемьева Е. А., Мельникова Л. А., Сахибуллина Д. М. Отработка режима низкотемпературной консервации штаммов *Bacillus anthracis*. *Ветеринария сегодня*. 2023; 12 (2): 171–177. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-2-171-177.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Для корреспонденции: Родионов Александр Павлович, кандидат ветеринарных наук, младший научный сотрудник лаборатории коллекции штаммов микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», 420075, Россия, Республика Татарстан, г. Казань, Научный городок-2, e-mail: alexandrjetspets@gmail.com.

Optimizing a low-temperature preservation technique for *Bacillus anthracis* strains

A. P. Rodionov, E. A. Artemeva, L. A. Melnikova, D. M. Sahibullina

FSBSI "Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety" (FSBSI "FCTRBS-ARRVI"), Kazan, Republic of Tatarstan, Russia

SUMMARY

The use of pure microbial cultures is associated with the following key challenges: storage, transportation and resuscitation after a long-term preservation. The currently used anthrax vaccines are produced using various strains of *Bacillus anthracis*. According to the storage passport data, anthrax strains are now stored in 30–40% glycerin solutions, which helps to preserve a sufficient number of viable cells without losses to their pathogenic properties for three years. It is obviously an urgent task to develop a long-term preservation technique for *Bacillus anthracis* strains. The aim of this study was to optimize a low-temperature preservation method for *Bacillus anthracis* strains that ensures viability and no losses to biological properties of the pathogen. Two vaccine strains of *Bacillus anthracis* were selected for the research: i.e. K-STI-79 and 55-VNIIVVIM and two cryoprotective media (No. 1 – 15% glycerin solution with 15% glucose solution and No. 2 – 30% neutral glycerin solution in saline solution). At first biological properties of the strains were studied and the number of viable cells was calculated. Later on, the strains were placed into low-temperature preservation facilities, at the temperature of –40 and –70 °C. Six months later, the effect of three thawing cycles on viability and biological properties of the agent was tested: i.e. at room temperature (22 ± 2) °C, in a water bath at a temperature of (37 ± 1) °C and in a household refrigerator at a temperature of (6 ± 2) °C. As demonstrated, the best option is to preserve the cells at –70 °C and thaw them in a water bath at (37 ± 1) °C. Further research will be focused on duration of the low-temperature preservation that will ensure appropriate viability and biological properties of the pathogen.

Keywords: anthrax, *Bacillus anthracis*, strains, low-temperature preservation

Acknowledgment: The work was carried out using the funds of the FSBSI "FCTRBS-ARRVI" within the research "Collecting, maintaining, replenishing and storing strains of highly dangerous diseases (HDD), keeping records of them, studying their biological properties and providing agro-industry companies with HDD strains".

For citation: Rodionov A. P., Artemeva E. A., Melnikova L. A., Sahibullina D. M. Optimizing a low-temperature preservation technique for *Bacillus anthracis* strains. *Veterinary Science Today*. 2023; 12 (2): 171–177. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-2-171-177.

Conflict of interests: The authors declare that there is no conflict of financial/non-financial interests associated with the paper.

For correspondence: Alexander P. Rodionov, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Junior Researcher, Laboratory for Collection of Strains of Microorganisms, FSBSI "FCTRBS-ARRVI", 420075, Russia, Republic of Tatarstan, Kazan, Nauchnyi gorodok-2, e-mail: alexandrjetspets@gmail.com.

ВВЕДЕНИЕ

Применение чистых культур штаммов микроорганизмов лежит в основе всех исследований в области инфекционных заболеваний, фундаментальной микробиологии, структурной и молекулярной биологии, а также имеет решающее значение в биотехнологии и биологической промышленности [1, 2]. Ключевой проблемой использования чистых культур микроорганизмов является их хранение, транспортировка, восстановление жизнеспособности после длительной консервации с сохранением ценных фенотипических и генотипических свойств [3, 4].

Подбор методов консервации и их адаптация к конкретному виду микроорганизма является важной задачей коллекций микроорганизмов, обеспечивающих научно-исследовательские лаборатории и биологические предприятия ценными штаммами возбудителей заболеваний [5]. Оптимально подобранные методы и режимы консервации обеспечивают сохранность жизнеспособности и биологических свойств конкретных штаммов микроорганизмов в течение длительного времени. Для этих целей в коллекционных центрах применяются различные способы консервации: субкультивирование, хранение под минеральным маслом, в воде и водно-солевых растворах, высушивание на твердых носителях, низкотемпературная консервация (от минус 10 до минус 80 °C и ниже), криоконсервация (хранение в жидком азоте при температуре минус 196 °C) и лиофилизация [6]. Из длительных методов хранения в лабораториях наиболее часто используют методы низкотемпературной консервации и лиофилизации.

Низкотемпературная консервация микроорганизмов представляет собой замораживание чистых культур бактерий или вирусов в криопротекторной среде, обеспечивающей защиту микробов от кристаллов льда в процессе хранения, замораживания и оттаивания [7, 8]. Срок хранения биологического материала при этом зависит от температуры хранения и скорости охлаждения/оттаивания [9]. Во многих коллекционных центрах бактериальные культуры успешно хранятся в современных морозильных камерах с температурным режимом до минус 86 °C [6].

Ллиофилизация – это процесс высушивания биоматериалов из замороженного состояния, при котором вода испаряется в условиях вакуума, минуя жидкую фазу, что позволяет сохранять структуру объекта, подвергнувшегося лиофилизации [7]. На сегодняшний день лиофилизация признается наиболее продолжительным методом хранения микроорганизмов, который,

кроме того, позволяет удобно транспортировать лиофилизированный материал [10].

Низкотемпературная консервация является более доступным методом, поскольку не требует наличия сложного оборудования (кроме морозильной камеры), тогда как лиофилизация требует более специализированного технического обеспечения и наличия инженерно-технического персонала соответствующего уровня [11]. Данный метод позволяет хранить клетки микроорганизмов без потери их свойств до 10 лет [5].

В отечественной и зарубежной литературе описаны исследования по хранению штаммов микроорганизмов при низких температурах, которые проводятся в основном на патогенных биологических агентах III–IV групп или на клетках промышленно ценных микробов [12–15]. Однако разработка методов консервации микроорганизмов, относящихся к I–II группам патогенности, необходима в не меньшей степени.

Большинство особо опасных заболеваний были побеждены человечеством посредством разработки различных иммунобиологических препаратов, основой в производстве которых являются чистые культуры микроорганизмов [16–19]. Сибирская язва – особо опасное зооантропонозное заболевание, широко распространенное во многих странах, возбудителем которого является спорообразующий микроорганизм *Bacillus anthracis* [20]. Относительное благополучие по данному заболеванию в нашей стране достигнуто путем проведения ежегодной вакцинации, охватывающей все поголовье восприимчивых животных, а также людей, подверженных возможному риску заражения данным патогеном [21]. Иммунизация животных и людей проводится вакцинами, созданными на основе живых клеток *B. anthracis* штаммов 55-ВНИИВВиМ и СТИ-1 соответственно [22]. Сохранение свойств штаммов данного возбудителя, способствующих выработке напряженно-противосибиреязвенного иммунитета, является необходимой и стратегически важной задачей для обеспечения биологической безопасности нашей страны.

В настоящее время штаммы возбудителя сибирской язвы хранятся в коллекционных центрах в лиофилизированном виде или в 30–40-процентных растворах глицерина в запаянных ампулах. Ллиофилизация клеток *B. anthracis* позволяет хранить их в течение десятилетий, однако недавние исследования отечественных авторов продемонстрировали, что лиофилизация штаммов возбудителей особо опасных болезней не позволяет добиться необходимого уровня биологической безопасности в процессе работы. Это связано с тем, что в процессе

лиофилизации культур создается облако аэрозоля, в котором содержатся клетки лиофилизируемого возбудителя [23]. Консервация *B. anthracis* в растворах глицерина является более безопасным способом, однако он позволяет хранить штаммы возбудителя не более 3 лет (согласно паспортным данным). В отечественной и зарубежной литературе не представлены сведения о хранении штаммов *B. anthracis* методом низкотемпературной консервации. Тем не менее, основываясь на известных данных [5, 6, 8], можно полагать, что этот способ позволит сделать манипуляции с культурой при консервации более безопасными, чем при лиофилизации, и сохранять жизнеспособность возбудителя более длительное время, чем при хранении штаммов в растворах глицерина. Вышеизложенные данные демонстрируют актуальность проведения работ, направленных на изыскание режима низкотемпературной консервации штаммов *B. anthracis*. Новизна работы заключается в сравнительном изучении сохранности жизнеспособных клеток *B. anthracis* и стабильности их биологических свойств при нескольких режимах низкотемпературной консервации с применением двух криопротекторных сред.

Исходя из вышесказанного, целью настоящей работы было отработать режим низкотемпературной консервации штаммов *B. anthracis*, обеспечивающий сохранность жизнеспособности и биологических свойств возбудителя.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы. В работе использовали два штамма возбудителя сибирской язвы: К-СТИ-79 и 55-ВНИИВВиМ, хранящиеся в коллекции в 30- и 40-процентном глицерине соответственно. Данные штаммы были отобраны для работы, исходя из соображений безопасности, так как являются вакцинными, сохраняя при этом все свойства возбудителя, за исключением капсулообразования.

Питательные среды: мясо-пептонный агар (МПА), мясо-пептонный бульон (МПБ), 5%-й кровяной МПА, 12%-й желатин, обезжиренное молоко, среда ГКИ, бульон Хоттингера производства ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ».

Реактивы. В работе применяли сыворотку крови лошадей неспецифическую неконсервированную производства ФКП «Курская биофабрика фирма – «БИОК» (Россия); генцианвиолет (ЧДА), фуксин основной (ЧДА), йод кристаллический (ЧДА), глюкозу кристаллическую (ЧДА), глицерин (ЧДА) производства ООО НПО «ТатХимПродукт» (Россия).

Оборудование. Работу с культурой осуществляли в боксе микробиологической безопасности БАВ-«Ламинар-С»-«Protect»-1,2 (ЗАО «Ламинарные системы», Россия). Посевы культивировали в термостате вертикальном водяном ТВ-40 (Россия). Микроскопию мазков проводили с использованием микроскопа МИКМЕД-5 (АО «ЛОМО», Россия). Центрифугирование осуществляли в настольной центрифуге ОПн-8 (ОАО «ТНК «Дастан», Киргизия).

Методы. Перед низкотемпературной консервацией штаммов проводили изучение их биологических свойств, указанных в паспортах, согласно МУК 4.2.2413-08 «Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы»¹.

После проверки свойств готовили суспензии клеток споровой формы в физиологическом растворе. Концентрацию жизнеспособных клеток в суспензиях определяли путем высева на МПА с последующим подсчетом количества колониеобразующих единиц (КОЕ)².

Затем приготовленную суспензию центрифугировали и удаляли надосады. Осевшие клетки смешивали с 1 см³ криопротекторной среды № 1 (15%-й раствор глицерина с 15%-м раствором глюкозы) и криопротекторной среды № 2 (30%-й нейтральный раствор глицерина на физиологическом растворе) и помещали в пластиковые криобирки с завинчивающимися крышками. После добавления защитных сред пробирки с полученной взвесью аккуратно вращали по вертикальной оси, выдерживали в течение 30 мин при комнатной температуре для лучшего смешивания среды с клетками и помещали на низкотемпературную консервацию при минус 40 и минус 70 °С.

В качестве сравнения также была подготовлена суспензия клеток, которую поместили в 30- и 40-процентные растворы глицерина (К-СТИ-79 и 55-ВНИИВВиМ соответственно) и хранили при 4 °С в соответствии с рекомендациями паспортов на штаммы.

Размораживание консервированных клеток проводили через 6 месяцев после помещения на консервацию до полного исчезновения кристаллов льда в пробирках несколькими способами:

- при комнатной температуре (22 ± 2) °С;
- на водяной бане при температуре (37 ± 1) °С;
- в бытовом холодильнике при температуре (6 ± 2) °С.

После размораживания делали последовательные десятикратные разведения в 0,9%-м физиологическом растворе с дальнейшим посевом полученных разведений на чашки Петри и подсчетом КОЕ. Для каждой пробы посев осуществляли в 5 чашек Петри. Биологические свойства изучаемых штаммов исследовали, как описано выше.

Для оценки статистической значимости полученных результатов использовали U-критерий Манна – Уитни. Статистически значимыми считали различия при $p \leq 0,01$ (после пересчета на число сравнений). Количественные данные на рисунке 3 и в таблице 2 представлены в виде $M \pm S_D$ (где M – среднее значение, S_D – стандартное отклонение) [24].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биологические свойства штаммов *B. anthracis* до низкотемпературной консервации. При оценке культурально-морфологических свойств установили, что в МПБ штаммы давали типичный для возбудителя сибирской язвы рост в виде комочка ваты на дне прозрачной среды (рис. 1А). При встряхивании к поверхности среды поднимались муаровые волны. К пятым суткам наблюдали образование ярко выраженного пристеночного кольца на поверхности среды. На МПА культуры давали рост в виде крупных сухих шероховатых колоний серовато-белого цвета с неровно очерченным краем (рис. 1В). Под малым увеличением микроскопа выросшие колонии имели волнистые края с отходящими извилистыми нитями – R-форма (рис. 2А). При микроскопии мазков, окрашенных по Граму, клетки

¹ МУК 4.2.2413-08 Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы: методические указания. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2009. 69 с. Режим доступа: <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293752/4293752010.pdf>.

² Лабинская А. С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. 4-е изд. перераб. и доп. М.: Медицина; 1978. 394 с.

исследованных штаммов представляли собой цепочки из крупных грамположительных палочковидных бактерий, образующих споры (рис. 2В).

При изучении подвижности было выявлено, что культуры подвижностью не обладают. Инкубация клеток на 5%-м кровяном агаре в течение 24 ч позволила установить отсутствие гемолитической активности. Штаммы давали типичный рост в виде перевернутой елочки в 12%-м желатине с характерным разжижением поверхности среды в виде чулка через пять суток. Культуры свертывали и пептонизировали обезжиренное молоко. При выращивании клеток на среде ГКИ с последующей окраской по методу Ребигера выявили отсутствие способности к капсулообразованию. Постановка теста «жемчужное ожерелье» показала, что штаммы чувствительны к пенициллину.

В результате изучения биологических свойств вакцинных штаммов К-СТИ-79 и 55-ВНИИВВиМ *B. anthracis*

установлено, что все свойства соответствовали паспортным данным и, за исключением капсулообразования, типичны для возбудителя сибирской язвы (табл. 1).

Определение количества колониеобразующих единиц штаммов B. anthracis перед закладкой на низкотемпературную консервацию. Следующим этапом работы было определение количества КОЕ каждого штамма перед добавлением криопротекторных сред. Для этого были приготовлены суспензии клеток в физиологическом растворе. После чего были проведены десятикратные разведения клеток до 10^{-5} с последующим посевом на чашки Петри с МПА, культивированием при 37 °С в течение 24 ч и подсчетом выросших колоний.

Среднее количество КОЕ двух исследуемых штаммов представлено на рисунке 3.

После подсчета выросших колоний приготовленные суспензии были подвергнуты центрифугированию при

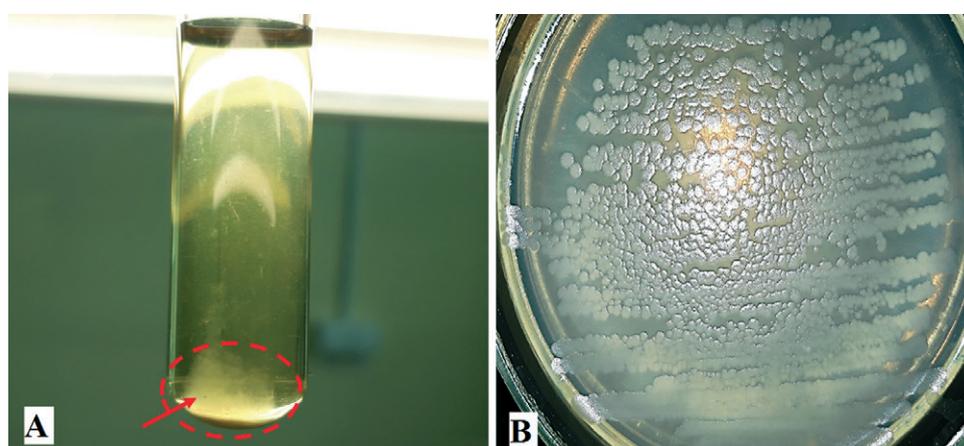


Рис. 1. Культуральные свойства штамма 55-ВНИИВВиМ *B. anthracis* через 24 ч культивирования: А – рост культуры в виде комочка ваты (указано стрелкой) в МПБ; В – рост колоний на МПА

Fig. 1. Culture properties of *B. anthracis* strain 55-VNIIVViM after 24-hour cultivation: А – culture growth looks like a lump of cotton wool (indicated by an arrow) in MPB; В – growth of colonies on MPA

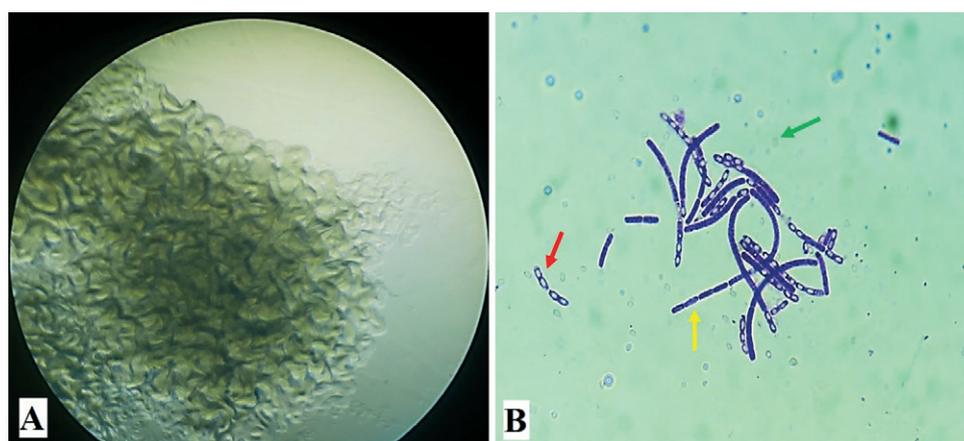


Рис. 2. Морфология колоний и форма клеток бактерий *B. anthracis* штамма 55-ВНИИВВиМ через 24 ч культивирования:

А – шероховатые R-формы колонии под малым увеличением (8×40);

В – окраска штамма по Граму (желтая стрелка – вегетативные формы клеток; красная – формирующиеся споры; зеленая – споры)

Fig. 2. Colony morphology and shape of *B. anthracis* bacteria strain 55-VNIIVViM cells after 24-hour cultivation: А – rough R-shaped colonies under low magnification (8×40); В – Gram staining of the strain (yellow arrow – vegetative cell forms; red – emerging spores; green – spores)

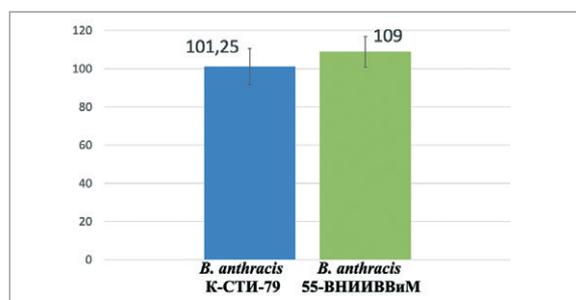


Рис. 3. Количество КОЕ ($M \pm S_d$) штаммов К-СТИ-79 и 55-ВНИИВВиМ *B. anthracis* до закладки на низкотемпературную консервацию

Fig. 3. CFU ($M \pm S_d$) of *B. anthracis* strains K-STI-79 and 55-VNIIVViM before a low-temperature preservation

4500 об/мин в течение 30 мин. Осевшие клетки смешали с 1 см³ криопротекторов, поместили на консервацию при минус 40 и минус 70 °С, а также в 30- и 40-процентный растворы глицерина при (6 ± 2) °С.

В качестве криозащитных сред были выбраны растворы 15%-го глицерина с 15%-й глюкозой и 30%-го глицерина. Выбор данных криопротекторов был обоснован теми факторами, что глицерин является наиболее широко используемой защитной средой. Начало применения растворов глицерина в различной концентрации при консервации патогенных прокариот и вирусов было положено еще в начале двадцатого века [25]. В настоящее время его использование в криоконсервации является «золотым стандартом» [26]. Применение раствора глюкозы обусловлено тем, что многие зарубежные авторы, занимающиеся данной тематикой, отмечали, что при добавлении в смесь криопротекторов от 1 до 18% глюкозы улучшается выживаемость разных видов микроорганизмов [8, 25]. Основанием для выбора сочетанного использования данных растворов в качестве защитной среды в нашем исследовании служило то, что глюкоза относится к протекторам, проникающим через клеточную стенку, но не проходящим через цитоплазматиче-

Таблица 1
Биологические свойства вакцинных штаммов К-СТИ-79 и 55-ВНИИВВиМ *B. anthracis*

Table 1
Biological properties of *B. anthracis* vaccine strains K-STI-79 and 55-VNIIVViM

Показатель/свойство	<i>B. anthracis</i> К-СТИ-79	<i>B. anthracis</i> 55-ВНИИВВиМ
Подвижность	–	–
Гемолитические свойства	–	–
Протеолитические свойства:		
12%-й желатин	+	+
обезжиренное молоко	+	+
Капсулообразование	–	–
Чувствительность к пенициллину	+	+
Спорообразование	+	+

скую мембрану. В то время как глицерин обладает возможностью проникновения через цитоплазматическую мембрану клеток [25]. Таким образом, можно предположить, что совместное использование данных растворов должно способствовать большей выживаемости замораживаемых клеток.

Сравнительная оценка эффективности низкотемпературной консервации штаммов B. anthracis. Результаты проделанной работы показали, что жизнеспособность клеток штаммов возбудителя сибирской язвы лучшим образом сохранялась при их консервации температурой минус 70 °С с дальнейшей разморозкой на водяной бане при 37 °С (табл. 2). При этом значительной разницы в сохранности жизнеспособности клеток при консервации их в разных криопротекторах обнаружено не было. Количество колониеобразующих единиц статистически значимо не отличалось от данного показателя при хранении в растворах глицерина в холодильной камере. При оценке полученных результатов следует учитывать тот факт, что подготовка клеток к низкотемпературной консервации сопряжена с их большой потерей во время центрифугирования, перед смешиванием с криопротектором, а также в процессе

Таблица 2
Количество КОЕ клеток *B. anthracis* после хранения при низких температурах в течение 6 месяцев ($M \pm S_d$)

Table 2
The CFU number of *B. anthracis* cells after a low temperature preservation for 6 months ($M \pm S_d$)

Криопротектор	Количество КОЕ до замораживания	Температура хранения	Количество КОЕ			
			после размораживания при температуре			после хранения в 30/40%-м глицерине при температуре
			(22 ± 2) °С	(37 ± 1) °С	(6 ± 2) °С	
<i>B. anthracis</i> 55-ВНИИВВиМ						
Среда № 1	109,00 ± 8,04	–40 °С	93,40 ± 1,81*	94,20 ± 2,58*	87,80 ± 5,71*	101,80 ± 3,96
		–70 °С	100,40 ± 2,96	101,60 ± 3,43	90,80 ± 2,86*	
Среда № 2		–40 °С	92,20 ± 2,77*	93,80 ± 3,11*	88,40 ± 4,77*	
		–70 °С	101,00 ± 2,12	102,40 ± 2,40	91,40 ± 3,20*	
<i>B. anthracis</i> К-СТИ-79						
Среда № 1	101,20 ± 9,50	–40 °С	94,20 ± 4,43	94,60 ± 3,64	88,00 ± 2,73*	101,20 ± 9,55
		–70 °С	100,20 ± 6,26	98,00 ± 4,47	86,40 ± 5,31	
Среда № 2		–40 °С	92,60 ± 4,82	92,00 ± 1,87*	90,20 ± 3,70	
		–70 °С	101,00 ± 4,30	97,40 ± 5,12	92,80 ± 3,34	

* статистически значимое различие ($p \leq 0,01$).

* statistically significant difference ($p \leq 0.01$).

замораживания и оттаивания, чего не происходит во время консервации штаммов в условиях бытового холодильника. Это позволяет говорить о том, что подобранная схема консервации позволяет сохранять большее число клеток, закладываемых на хранение, чем при остальных режимах.

Клетки штаммов, хранящиеся при температуре минус 40 °С, при всех режимах оттаивания сохранили свою жизнеспособность значительно меньше. Однако размораживание при 37 °С позволило сохранить большее количество жизнеспособных клеток. Полученные результаты можно объяснить тем, что режим хранения при температуре минус 40 °С не позволяет добиться полной остановки процесса рекристаллизации. Размораживание хранившихся клеток в условиях холодильника значительно удлиняет процесс оттаивания. Это также может способствовать более длительной рекристаллизации льда, что является одним из главных факторов, разрушающих замороженные клетки [8, 26].

После подсчета количества колониеобразующих единиц клеток, подвергшихся низкотемпературной консервации, была проведена оценка сохранности их биологических свойств, которая продемонстрировала полное соответствие паспортным данным.

Таким образом, можно сказать, что подобранный режим низкотемпературной консервации штаммов возбудителя сибирской язвы при температуре минус 70 °С является перспективным для продолжения работы. Дальнейшие исследования будут направлены на изучение длительности хранения штаммов при низкотемпературном режиме консервации с сохранением жизнеспособности и биологических свойств возбудителя.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования продемонстрировали, что культуры возбудителя сибирской язвы, хранившиеся при температуре минус 40 и минус 70 °С, сохранили свою жизнеспособность и биологические свойства в течение 6 месяцев. Сопоставление результатов консервации клеток при двух температурных режимах позволило сделать вывод, что более предпочтительным является хранение при минус 70 °С.

Сравнительная оценка хранения клеток *B. anthracis* в двух растворах защитных сред на данном этапе исследований не позволила выявить наиболее эффективный из них. Данная работа будет повторена через более длительные промежутки времени хранения, в результате чего предполагается выбрать оптимальный криопротектор.

При сравнении трех методов размораживания клеток исследованных штаммов было установлено, что наиболее щадящим режимом явился способ оттаивания на водяной бане при температуре 37 °С, который позволил сохранить наибольшее число жизнеспособных клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Heylen K., Hoefman S., Vekeman B., Peiren J., De Vos P. Safeguarding bacterial resources promotes biotechnological innovation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012; 94: 565–574. DOI: 10.1007/s00253-011-3797-y.
- Никитина З. К., Гордонова И. К., Насибов Э. М. Изучение коллагенолитических свойств коллекционных штаммов микромицетов при длительном хранении. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.* 2021; 24 (3): 33–39. DOI: 10.29296/25877313-2021-03-05.
- Артемьева Е. А., Мельникова Л. А., Родионов А. П. Опыт длительного хранения референтного штамма С-141 возбудителя мелиоидоза (*Burkholderia pseudomallei*). *Ветеринария сегодня.* 2022; 11 (3): 268–272. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-3-268-272.

- 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; 10 (3): 243–247. DOI: 10.29326/2304-196X-2021-3-38-243-247.
- Грачева И. В., Осин А. В. Низкотемпературная консервация коллекционных штаммов холерных вибрионов. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2014; (4): 39–42. DOI: 10.21055/0370-1069-2014-4-39-42.
- Похиленко В. Д., Баранов А. М., Детушев К. В. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития. *Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки.* 2009; 4 (12): 99–121. EDN: LAKPFХ.
- Fisore D., McCoy T. Editorial: freeze-drying and process analytical technology for pharmaceuticals. *Front. Chem.* 2018; 6:622. DOI: 10.3389/fchem.2018.00622.
- Грачева И. В., Валова Т. В., Григорьева Г. В. Традиционные и новые защитные среды для низкотемпературной консервации бактерий. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2011; (4): 36–40. DOI: 10.21055/0370-1069-2011-4(110)-36-40.
- Молчанова Е. В., Агеева Н. П. Научно-методические аспекты совершенствования деятельности коллекции патогенных микроорганизмов Волгоградского научно-исследовательского противочумного института. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 2018; 95 (3): 117–126. DOI: 10.36233/0372-9311-2018-3-117-126.
- Cui S., Hu K., Qian Z., Mao B., Zhang Q., Zhao J., et al. Improvement of freeze-dried survival of *Lactiplantibacillus plantarum* based on cell membrane regulation. *Microorganisms.* 2022; 10 (10):1985. DOI: 10.3390/microorganisms10101985.
- Малахаева А. Н., Ляшова О. Ю., Плотников О. П., Осин А. В. Хранение штаммов *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ и *Brucella abortus* 19 ВА в жизнеспособном состоянии путем их глубокого замораживания. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2015; (1): 63–66. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-1-63-66.
- Савкина О. А., Терновской Г. В., Локачук М. Н., Павловская Е. Н., Сафронова В. И. Криоконсервация – перспективный метод хранения промышленно ценных штаммов молочнокислых бактерий и дрожжей. *Сельскохозяйственная биология.* 2014; 49 (4): 112–119. DOI: 10.15389/agrobiology.2014.4.112rus.
- Ермолова В. П., Гришечкина С. Д., Нижников А. А. Активность энтомопатогенных штаммов-продуцентов *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* при разных методах хранения. *Сельскохозяйственная биология.* 2018; 53 (1): 201–208. DOI: 10.15389/agrobiology.2018.1.201rus.
- Liu M., Chen C., Yu J., Zhang H., Liang L., Guo B., et al. The gelatin-based liquid marbles for cell cryopreservation. *Mater. Today Bio.* 2022; 17:100477. DOI: 10.1016/j.mtbio.2022.100477.
- Ali P., Fucich D., Shah A. A., Hasan F., Chen F. Cryopreservation of cyanobacteria and eukaryotic microalgae using exopolysaccharide extracted from a glacier bacterium. *Microorganisms.* 2021; 9 (2):395. DOI: 10.3390/microorganisms9020395.
- Сидорчук А. А. История создания вакцин и вакцинации. Часть II. Оспа и сибирская язва. *Российский ветеринарный журнал.* 2018; (6): 12–14. DOI: 10.32416/article_5c050ab91c6a36.36611669.
- Сидорчук А. А. История создания вакцин и вакцинации. Часть III. Бешенство и туберкулез. *Российский ветеринарный журнал.* 2019; (2): 25–28. DOI: 10.32416/article_5cd16d076a75a6.23029629.
- Сидорчук А. А. История создания вакцин и вакцинации. Часть IV. Чума и контактная плевропневмония крупного рогатого скота. *Российский ветеринарный журнал.* 2019; (6): 35–38. DOI: 10.32416/2500-4379-2019-2019-6-35-38.
- Сидорчук А. А. История создания вакцин и вакцинации. Часть V. Ящур. *Российский ветеринарный журнал.* 2020; (2): 27–30. DOI: 10.32416/2500-4379-2020-2-27-30.
- Родионов А. П., Артемьева Е. А., Мельникова Л. А., Косарев М. А., Иванова С. В. Особенности природной очаговости сибирской язвы и экологии *Bacillus anthracis*. *Ветеринария сегодня.* 2021; (2): 151–158. DOI: 10.29326/2304-196X-2021-2-37-151-158.
- Лягоскин И. В., Васина Н. К., Егорова И. Ю., Селянинов Ю. О. Конструирование сибиреязвенных эритроцитарных антигенных диагностикомов. *Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук.* 2012; (6): 73–76. EDN: PMBHXL.
- Егорова И. Ю., Севских Т. А., Селянинов Ю. О. Иммунобиологические свойства нового бескапсульного штамма *Bacillus anthracis* 363/11. *Биотехнология.* 2015; 31 (5): 34–40. EDN: VLDZXL.
- Жилченко Е. Б., Жаринова Н. В., Сердюк Н. С., Коняева О. А., Гаврилова О. Н. Обеспечение биологической безопасности при лиофилизации микроорганизмов I–II групп патогенности. *Здоровье населения и среда обитания – ЗНУСО.* 2019; (1): 46–50. DOI: 10.35627/2219-5238/2019-310-1-46-50.
- Баврина А. П. Современные правила применения параметрических и непараметрических критериев в статистическом анализе

медико-биологических данных. *Медицинский альманах*. 2021; 1 (66): 64–73. EDN: IZKMBZ.

25. Hubálek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*. 2003; 46 (3): 205–229. DOI: 10.1016/s0011-2240(03)00046-4.

26. Hasan M., Fayter A. E. R, Gibson M. I. Ice recrystallization inhibiting polymers enable glycerol-free cryopreservation of microorganisms. *Biomacromolecules*. 2018; 19 (8): 3371–3376. DOI: 10.1021/acs.biomac.8b00660.

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. DOI: 10.1007/s00253-011-3797-y.

2. Nikitina Z. K., Gordonova I. K., Nasibov E. M. Collagenolytic properties of micromycetes collection strains during long-term storage study. *Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry*. 2021; 24 (3): 33–39. DOI: 10.29296/25877313-2021-03-05. (in Russ.)

3. Artemeva E. A., Melnikova L. A., Rodionov A. P. Long-term storage of C-141 reference strain of melioidosis agent (*Burkholderia pseudomallei*). *Veterinary Science Today*. 2022; 11 (3): 268–272. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-3-268-272.

4. Artemeva E. A., Melnikova L. A., Rodionov A. P. Preparation and transfer of *Burkholderia mallei* production strain 5584 in accordance with the biosafety requirements. *Veterinary Science Today*. 2021; 10 (3): 243–247. DOI: 10.29326/2304-196X-2021-3-38-243-247.

5. Gracheva I. V., Osin A. L. Low-temperature conservation of collection cholera vibrio strains. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2014; (4): 39–42. DOI: 10.21055/0370-1069-2014-4-39-42. (in Russ.)

6. Pokhilenko V. D., Baranov A. M., Detushev K. V. Metody dlitel'nogo khraneniya kolleksionnykh kul'tur mikroorganizmov i tendentsii razvitiya = Methods of long-term storage for collection microbial cultures and their optimization. *University proceedings. Volga region. Medical sciences*. 2009; 4 (12): 99–121. EDN: LAKPFX. (in Russ.)

7. Fissore D., McCoy T. Editorial: freeze-drying and process analytical technology for pharmaceuticals. *Front. Chem.* 2018; 6:622. DOI: 10.3389/fchem.2018.00622.

8. Gracheva I. V., Valova T. V., Grigor'eva G. V. Traditional and modern protective media for the low-temperature bacteria preservation. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2011; (4): 36–40. DOI: 10.21055/0370-1069-2011-4(110)-36-40. (in Russ.)

9. Molchanova E. V., Ageeva N. P. Scientific and methodological support for development of pathogenic microorganism collection of Volgograd research institute for plague control. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2018; 95 (3): 117–126. DOI: 10.36233/0372-9311-2018-3-117-126. (in Russ.)

10. Cui S., Hu K., Qian Z., Mao B., Zhang Q., Zhao J., et al. Improvement of freeze-dried survival of *Lactiplantibacillus plantarum* based on cell membrane regulation. *Microorganisms*. 2022; 10 (10):1985. DOI: 10.3390/microorganisms10101985.

11. Malakhaeva A. N., Lyashova O. Yu., Plotnikov O. P., Osin A. V. Maintenance of *Francisella tularensis* 15 RIEN and *Brucella abortus* 19 BA strains in a viable state by means of deep freezing. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2015; (1): 63–66. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-1-63-66. (in Russ.)

12. Savkina O. A., Ternovskoi G. V., Lokachuk M. N., Pavlovskaya E. N., Safronova V. I. Cryopreservation to be a progressive method for keeping up valuable strains of lactic acid bacteria and yeasts. *Agricultural Biology*. 2014; 49 (4): 112–119. DOI: 10.15389/agrobiology.2014.4.112rus. (in Russ.)

13. Ermolova V. P., Grishchekina S. D., Nizhnikov A. A. Activity of insecticidal *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* strains stored by various methods. *Agricultural Biology*. 2018; 53 (1): 201–208. DOI: 10.15389/agrobiology.2018.1.201eng.

14. Liu M., Chen C., Yu J., Zhang H., Liang L., Guo B., et al. The gelatin-based liquid marbles for cell cryopreservation. *Mater. Today Bio*. 2022; 17:100477. DOI: 10.1016/j.mtbio.2022.100477.

15. Ali P., Fucich D., Shah A. A., Hasan F., Chen F. Cryopreservation of cyanobacteria and eukaryotic microalgae using exopolysaccharide extracted from a glacier bacterium. *Microorganisms*. 2021; 9 (2):395. DOI: 10.3390/microorganisms9020395.

16. Sidorchuk A. A. History of vaccines and vaccination. Part II. Pox and anthrax. *Russian Veterinary Journal*. 2018; (6): 12–14. DOI: 10.32416/article_5c050ab91c6a36.36611669. (in Russ.)

17. Sidorchuk A. A. History of vaccines and vaccination. Part III. Rabies and tuberculosis. *Russian Veterinary Journal*. 2019; (2): 25–28. DOI: 10.32416/article_5cd16d076a75a6.23029629. (in Russ.)

18. Sidorchuk A. A. History of vaccines and vaccination. Part IV. Rinderpest and contagious pleuropneumonia of cattle. *Russian Veterinary Journal*. 2019; (6): 35–38. DOI: 10.32416/2500-4379-2019-2019-6-35-38. (in Russ.)

19. Sidorchuk A. A. History of vaccines and vaccination. Part V. Foot-and-mouth disease. *Russian Veterinary Journal*. 2020; (2): 27–30. DOI: 10.32416/2500-4379-2020-2-27-30. (in Russ.)

20. Rodionov A. P., Artemeva E. A., Melnikova L. A., Kosarev M. A., Ivanova S. V. Features of anthrax natural foci and *Bacillus anthracis* ecology. *Veterinary Science Today*. 2021; (2): 151–158. DOI: 10.29326/2304-196X-2021-2-37-151-158.

21. Lyagoskin I. V., Vasina N. K., Yegorova I. Yu., Selyaninov Yu. O. Constructing anthrax erythrocyte antigenic diagnostics. *Vestnik of the Russian agricultural science*. 2012; (6): 73–76. EDN: PMBHLX. (in Russ.)

22. Egorova I. Yu., Sevskii T. A., Selyaninov Yu. O. Immunobiological properties of new unencapsulated *Bacillus anthracis* 363/11 strain. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2016; 52 (8): 733–738. DOI: 10.1134/S0003683816080044.

23. Zhilchenko E. B., Zharinova N. V., Serdyuk N. S., Konyayeva O. A., Gavrilova O. N. Ensuring biological safety during lyophilization for microorganisms of I–II pathogenicity groups. *Public Health and Life Environment – PH&LE*. 2019; (1): 46–50. DOI: 10.35627/2219-5238/2019-310-1-46-50. (in Russ.)

24. Bavrina A. P. Modern rules for the use of parametric and nonparametric tools in the statistical analysis of biomedical data. *Medical Almanac*. 2021; 1 (66): 64–73. EDN: IZKMBZ. (in Russ.)

25. Hubálek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*. 2003; 46 (3): 205–229. DOI: 10.1016/s0011-2240(03)00046-4.

26. Hasan M., Fayter A. E. R, Gibson M. I. Ice recrystallization inhibiting polymers enable glycerol-free cryopreservation of microorganisms. *Biomacromolecules*. 2018; 19 (8): 3371–3376. DOI: 10.1021/acs.biomac.8b00660.

Поступила в редакцию / Received 17.02.2023

Поступила после рецензирования / Revised 20.03.2023

Принята к публикации / Accepted 30.03.2023

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Родионов Александр Павлович, кандидат ветеринарных наук, младший научный сотрудник лаборатории коллекции штаммов микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-0853-5678>, e-mail: alexandrvetspets@gmail.com.

Артемяева Елена Александровна, кандидат ветеринарных наук, заведующий лабораторией коллекции штаммов микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-6204-6077>, e-mail: artemevaelena21@mail.ru.

Мельникова Лилия Арсентьевна, кандидат ветеринарных наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории коллекции штаммов микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-0159-3843>, e-mail: vnivi@mail.ru.

Сахибуллина Дания Минзагитовна, старший лаборант лаборатории коллекции штаммов микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-2333-9704>.

Alexander P. Rodionov, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Junior Researcher, Laboratory for Collection of Strains of Microorganisms, FSBSI "FCTRBS-ARRVI", Kazan, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-0853-5678>, e-mail: alexandrvetspets@gmail.com.

Elena A. Artemeva, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of Laboratory for Collection of Strains of Microorganisms, FSBSI "FCTRBS-ARRVI", Kazan, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-6204-6077>, e-mail: artemevaelena21@mail.ru.

Lilia A. Melnikova, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Associate Professor, Leading Researcher, Laboratory for Collection of Strains of Microorganisms, FSBSI "FCTRBS-ARRVI", Kazan, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-0159-3843>, e-mail: vnivi@mail.ru.

Daniya M. Sahibullina, Senior Laboratory Technician, Laboratory for Collection of Strains of Microorganisms, FSBSI "FCTRBS-ARRVI", Kazan, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-2333-9704>.