

Развитие инструментальных методов исследования бактерий в ГНЦ ПМБ

И.Г.Говорунов

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация

В работе ретроспективно представлены исследования бактерий нефелометрическими, флуориметрическими, ионометрическими и микроскопическими методами. Показаны основные результаты исследований влияния низкотемпературного замораживания-оттаивания, лиофилизации и детергентов различных классов на оболочечный комплекс грамотрицательных бактерий. На примере отдельных представителей грамотрицательных бактерий освещены перспективы и ограничения данных методов в области исследования их структурно-функциональной организации.

Для цитирования: Говорунов И.Г. Развитие инструментальных методов исследования бактерий в ГНЦ ПМБ. Бактериология. 2019; 4(2): 55–60. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-2-55-60

Development of instrumental methods of studying bacteria in SCRAMB

I.G.Govorunov

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

A retrospective study of bacteria by nephelometric, fluorimetric, ionometric, and microscopic methods are presented. The main results of studies of the effect of low-temperature freezing-thawing, lyophilization and detergents of various classes on the shell complex of gram-negative bacteria are shown. On the example of individual representatives of gram-negative bacteria, the perspectives and limitations of these methods in the field of the study of their structural and functional organization are highlighted.

For citation: Govorunov I.G. Development of instrumental methods of studying bacteria in SCRAMB. Bacteriology. 2019; 4(2): 55–60. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2019-2-55-60

Небольшая группа выпускников биофака Днепропетровского университета прибыла по распределению во Всесоюзный научно-исследовательский институт прикладной микробиологии (ВНИИ ПМ) в начале августа 1976 г. В этот год таких прибывших было сотни полторы. Весь институт помещался в одноэтажном здании барачного типа на окраине подмосковного поселка Протвино. Градообразующим предприятием поселка с 25-тысячным населением (а ныне наукограда) был Институт физики высоких энергий.

Трудоустройством научных сотрудников занимался Константин Иванович Волковой, возглавлявший тогда отдел генетики. Значительную часть сотрудников направляли на стажировку или в аспирантуру в крупные научно-исследовательские центры медико-биологического профиля в Москву, Ленинград, Саратов, Волгоград, Пущино-на-Оке и др. Остальные должны были осваивать строящийся институт.

Первые корпуса вспомогательного лабораторного городка (ВЛГ) мы увидели лишь в октябре. До этого несколько бригад будущих ученых и специалистов трудились на сельхозработках в совхозе «Большевик» Серпуховского района.

Меня направили в лабораторию №5 под руководством к.б.н. В.В.Перельгина (в настоящее время ведущий научный сотрудник отдела биологических технологий), в группу с.н.с.



Говорунов Игорь Геннадиевич кандидат биологических наук, старший научный сотрудник. Работает во ФБУН ГНЦ ПМБ с 1976 года, в настоящее время в должности ведущего научного сотрудника. Возглавляет отдел информационных технологий. Ответственный секретарь журнала «Бактериология». Автор более 70 научных работ, включая одно изобретение и 4 базы данных. Специализируется в области мониторинга инфекционных заболеваний и визуализации геопространственной информации.

Е.О.Пучкова (ныне доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник Всероссийской коллекции микроорганизмов, ИБФМ РАН). В разное время в группе работали Н.В.Косарев, С.А.Иванов, Т.Ю.Кудрявцева, до сих пор работающие в институте, Н.В.Петухова, В.А.Пинчукова, Н.В.Трофименко, М.М.Спирин. Группа занималась изучением обо-



К.И.Волковой,
доктор медицинских наук,
профессор, полковник военно-
медицинской службы в отставке,
в последней должности –
главный научный сотрудник.
До этого длительное время
возглавлял отдел генетики.
Фото 2000 г.

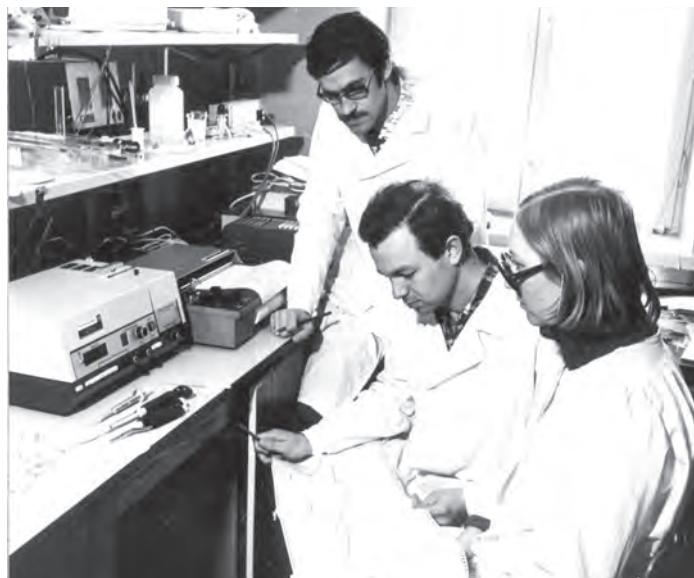
лочечного комплекса бактерий и исследованием влияния на него различных повреждающих агентов: детергентов, высушивания, замораживания-оттаивания. Традиционным объектом исследований была *E. coli*. Использовался широкий спектр методов исследования: флуориметрия и фотометрия, ионометрия, различные модификации световой микроскопии. Многие работы выполнялись в содружестве с сотрудниками лаборатории №6 под руководством В.Я.Волкова (ЯМР-спектроскопия), вычислительного центра и др. Мне поручили заниматься изучением криовоздействий на микробную клетку.

Криобиология тогда была на пике своего развития. В Харькове был создан Институт проблем криобиологии и криомедицины, издавался журнал «Криобиология», в Институте биофизики (Пушино-на-Оке) Б.Н.Вепринцев развернул работы по сохранению генофонда редких животных путем криоконсервации. Он же организовал ряд семинаров по криобиологии и издание брошюр серии «Консервация генетических ресурсов».

Что же касается тематики лаборатории №5, то с теоретической точки зрения считалось, что наиболее перспективным методом хранения бактерий является низкотемпературное замораживание, поскольку при температурах кипения сжиженных газов скорости химических реакций практически равны нулю. Существенным недостатком криоконсервации была инаktivация части бактериальной популяции под действием повреждающих факторов замораживания-оттаивания. В связи с этим необходимо было разработать эффективные режимы хранения бактерий и способы их защиты от криоповреждений на основе исследования механизмов возникновения этих повреждений.

Известно, что при замораживании бактерий повреждаются главным образом их мембраны, поэтому передо мной поставили задачи разработки методов выявления повреждений барьерных свойств мембран после замораживания-оттаивания, исследования повреждений мембран с помощью этих методов и выявления влияния этих повреждений на жизнеспособность микробной клетки при различных холодовых воздействиях.

Для регистрации целостности барьерных свойств цитоплазматической мембраны было решено использовать реакцию плазмолиза – осмотическую реакцию клеток при помещении в гипертоническую среду, сопровождающуюся сжатием протопласта и отслоением цитоплазматической мембраны от клеточной стенки. В университете на кафедре



Обсуждение результатов эксперимента. Слева направо: м.н.с. И.Г.Говорунов, с.н.с. Е.О.Пучков, ст. лаб. В.А.Пинчукова (1978 г.)

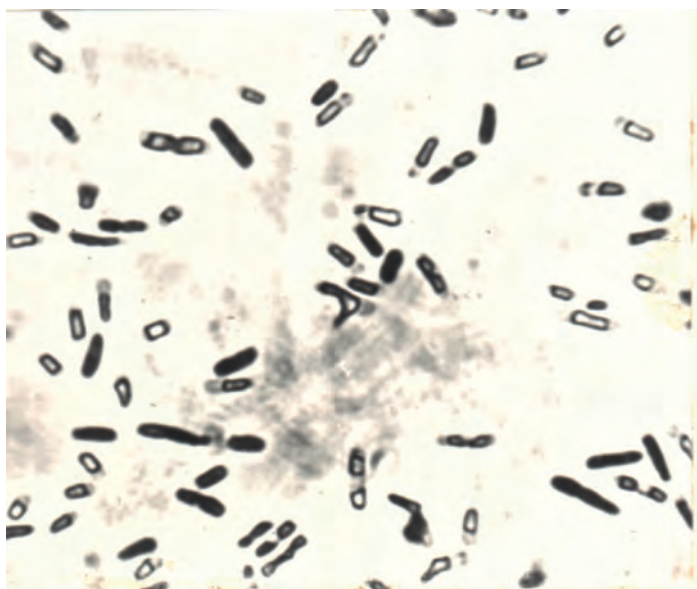
физиологии растений я впервые увидел плазмолиз на препарате кожицы лука. Возможно, самое первое наблюдение этой реакции у бактерий описал доктор А.Иванов в 1901 г. [К вопросу о плазмолизе бактерий [Из Бактериол. ин-та Моск. ун-та]; [Соч.] Д-ра мед. Александра Иванова. – Санкт-Петербург: К.Л. Риккер, 1901. – 15 с.; 24].

Реакция плазмолиза сопровождается изменением оптических свойств клеточной суспензии – возрастает светорассеяние. Вслед за этим может наступить деплазмолиз – набухание протопласта, сопровождающееся уменьшением оптической плотности (светорассеяния) суспензии клеток. Параметры этой реакции и, в частности, их практическое использование на тот момент были слабо изучены.

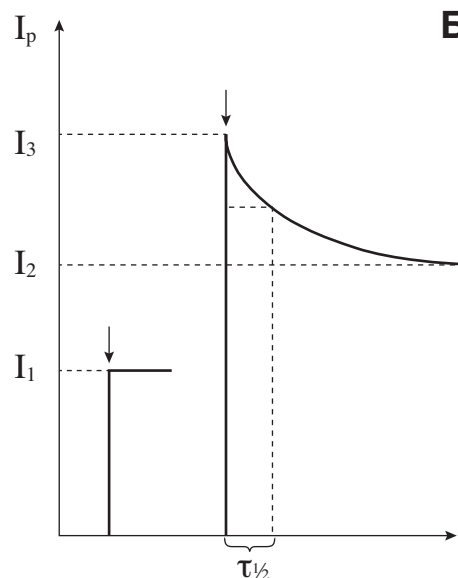
Поскольку лаборатория №5 только организовалась, то оборудования в ней еще не было. Многие установки и приборы мы делали или модифицировали самостоятельно. Под руководством Е.О.Пучкова я смонтировал установку на базе флуориметра ЭФ-3М, дополнив его стабилизатором напряжения ртутной лампы и самописцем КСП-4. Сильный разогрев от ртутной лампы компенсировали термостатированием измерительной ячейки. Прибор позволял регистрировать как светорассеяние, так и флуоресценцию. Позднее работы были продолжены на флуориметре Perkin-Elmer 1000.

В результате проведенных исследований были определены оптимальные условия регистрации оптических изменений суспензии бактериальных клеток при плазмолизе, а также была установлена зависимость этой реакции от физиологического состояния клеток (фаза роста, среда культивирования). Для количественной оценки регистрации реакции плазмолиза бактерий по светорассеянию были предложены параметры: интенсивность плазмолиза, степень и скорость деплазмолиза. А по изменению первого параметра в средах с различной осмолярностью можно было определять внутриклеточное осмотическое давление.

Опыты по селективному (грамицидин D) и неселективно (толуол) повреждению барьерных свойств мембран бактерий показали, что по мере разрушения мембран интенсивность плазмолиза падала, причем светорассеяние суспен-



А



Б

Плазмолиз бактерий *E. coli*. А – микрофотография, фазовый контраст. Б – светорассеяние суспензии клеток *E. coli* при плазмолизе (слева – водная суспензия, справа – суспензия в концентрированном растворе KCl).

зии в воде не изменялось. Поскольку цитоплазматическая мембрана, в отличие от наружной мембраны грамотрицательных бактерий, представляет барьер проницаемости для низкомолекулярных веществ (неорганические соли, сахара), то отсутствие реакции плазмолиза и соответствующего уменьшения светорассеяния суспензии в гипертоническом растворе может быть показателем нарушения ее барьерных свойств. На этом был построен метод регистрации нарушения барьерных свойств цитоплазматической мембраны.

В основу регистрации повреждений внешней мембраны, непроницаемой для ряда красителей, мы положили взаимодействие клеток с бромистым этидием. Этот краситель при связывании с нуклеиновыми кислотами сильно флуоресцирует, что обусловлено интеркаляцией молекул красителя между азотистыми основаниями нуклеиновых кислот и возрастанием квантового выхода флуоресценции. Было обнаружено, что с интактными клетками *E. coli* краситель не взаимодействует. В то же время в присутствии ЭДТА и детергентов краситель диффундирует через цитоплазматическую мембрану бактерий, связывается внутриклеточной ДНК, что сопровождается увеличением флуоресценции. Поскольку ЭДТА избирательно повреждал только внешнюю

мембрану, то мы использовали этот феномен для оценки повреждения именно внешней мембраны.

В дальнейших исследованиях мы оценивали повреждение внешней и цитоплазматической мембраны *E. coli* при низкотемпературном замораживании и других экстремальных воздействиях.

В целях выделения отдельных повреждающих факторов мы разбили процесс замораживания-оттаивания на отдельные этапы, прохождение которых контролировали при помощи откалиброванной термопары, помещаемой в замораживаемый образец. Использование этого методического приема позволило выявить различия в чувствительности внешней и цитоплазматической мембран бактерий к холодovým воздействиям.

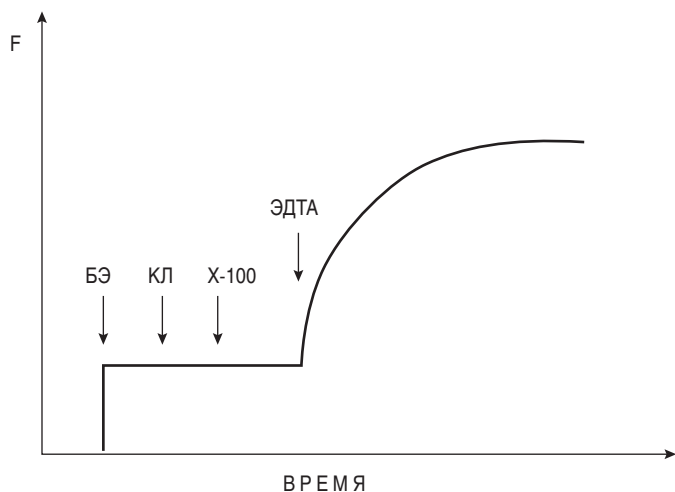
1) Холодовой шок вызывал временные повреждения цитоплазматической мембраны, зарегистрированные по выходу внутриклеточного K^+ , которые восстанавливались при отогреве. Дыхательная активность клеток, способность к плазмолизу и жизнеспособность оставались без изменений. При этом барьерные свойства внешней мембраны для бромистого этидия не изменялись – внешняя мембрана не повреждалась.

2) Внеклеточная кристаллизация льда приводила к повреждению внешней мембраны. Поскольку по мере кристаллизации льда в водном растворе происходит концентрирование присутствующих солей, то мы предположили, что это и есть причина повреждения целостности внешней мембраны. Это подтверждалось опытами с кратковременным выдерживанием бактерий в растворе NaCl. Конкурентное взаимодействие одновалентных катионов (K^+ , Na^+) с ионами Mg^{+2} , стабилизирующими липополисахарид внешней мембраны, было аналогично действию ЭДТА на клетки.

3) Низкотемпературное замораживание, при котором происходит и внутриклеточная кристаллизация воды, приводило к устойчивому повреждению и цитоплазматической мембраны, о чем свидетельствует снижение интенсивности плазмолиза.



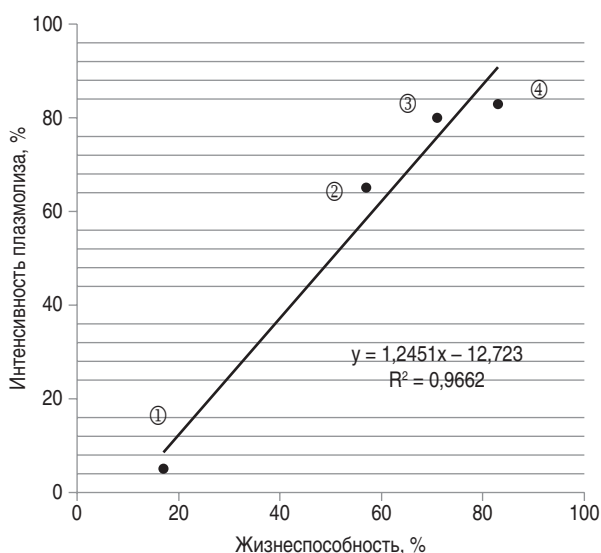
Флуориметр ЭФ-3М.



Влияние ЭДТА и тритона X-100 на проницаемость оболочки *E. coli* для бромистого этидия. Стрелками показаны моменты внесения в кювету красителя (БЭ), клеток (КЛ), детергента (X-100) и ЭДТА.

Известно, что стойкое нарушение барьерных свойств цитоплазматической мембраны бактерий, в отличие от таковых внешней мембраны, существенным образом влияет на жизнеспособность бактериальной клетки. В связи с этим мы изучили корреляцию между изменениями плазмолитической реакции и жизнеспособностью бактерий, определяемой после высева на чашки Петри с питательной средой (КОЕ). Варьируя условия замораживания (присутствие/отсутствие криопротекторов, добавки NaCl), мы получали образцы с различным уровнем инактивации бактерий. При этом оказалось, что жизнеспособность популяции коррелирует с интенсивностью плазмолиза, определяемой по светорассеянию. На этом был построен экспресс-метод оценки жизнеспособности бактерий.

По результатам этих исследований под руководством д.б.н. Ю.В.Евтодиенко (Институт биофизики АН, Пущино-на-Оке) и Е.О.Пучкова я подготовил и защитил кандидатскую диссертацию.



Корреляционный анализ жизнеспособности и интенсивности плазмолиза суспензий *E. coli* после замораживания-оттаивания в различных средах: 1 – NaCl; 2 – H₂O; 3 – ДМСО (7%); 4 – глицерин (1%).

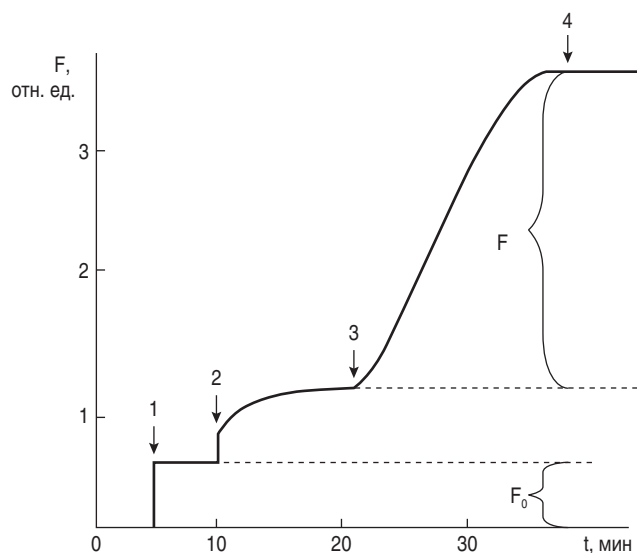
цию. Кроме руководителей, в оформлении и собственно защите мне, как и многим другим соискателям и аспирантам, оказал неоценимую помощь тогдашний ученый секретарь института Юрий Михайлович Помыткин. За время его работы в центре было защищено более 50 докторских и 200 кандидатских диссертаций. Закончили аспирантуру более 120 сотрудников. Практически все защиты прошли без замечаний.

В технологии приготовления и хранения лиофильно высушенных бактериальных препаратов существует проблема контроля качества, в частности, содержания (концентрации) жизнеспособных клеток. Это актуально также при поддержании музейных коллекций.

Использовать реакцию плазмолиза для оценки жизнеспособности лиофильно высушенных бактерий было нецелесообразно, поскольку после этой процедуры в суспензии присутствовали наряду с жизнеспособными клетками мертвые клетки, остатки клеточной стенки и пр., что существенно искажало данные светорассеяния. Использование фазово-контрастной микроскопии было невозможно по тем же причинам. Основываясь на ранее полученных данных о возможности определения общей концентрации бактериальных клеток в суспензии, а также жизнеспособности популяции после замораживания-оттаивания по флуоресценции бромистого этидия, мы исследовали взаимодействие красителя с лиофильно высушенными препаратами бактерий после их регидратации с целью разработки экспресс-метода определения концентрации жизнеспособных клеток в этих препаратах.

Было установлено, что взаимодействие красителя с лиофилизированными-регидратированными культурами бактерий позволяет выявить по крайней мере три субпопуляции клеток:

- а) клетки, у которых отсутствует барьер проницаемости для бромистого этидия;
- б) клетки с поврежденной внешней мембраной (предположительно);
- в) неповрежденные клетки (предположительно).



Взаимодействие лиофилизированных/регидратированных клеток *Y. pestis* с бромистым этидием. Стрелками показаны моменты внесения в измерительную кювету: 1 – раствора бромистого этидия; 2 – исследуемой суспензии клеток; 3 – раствора цетилтриметиламмонийбромид (ЦТАБ).

Гетерогенность популяции лиофилизированных-регидратированных культур подтверждалась данными фазово-контрастной (морфологическая гетерогенность) и флуоресцентной (по разной светимости клеток, окрашенных бромистым этидием) микроскопии, а также цитометрическими измерениями (флуоресценция и светорассеяние отдельных клеток).

Корреляционный анализ флуоресценции неповрежденной части популяции с данными высева на плотную питательную среду (КОЕ) позволил выявить линейную связь ($R^2 > 0,88$) между ними в отношении 17 произвольно отобранных лиофильно высушенных препаратов авирулентных культур *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia pestis*.

Данный подход было предложено использовать в качестве экспресс-метода оценки концентрации жизнеспособных клеток в лиофилизированных/регидратированных препаратах сухих живых вакцин и пробиотических препаратов грамотрицательных бактерий на этапах оптимизации процесса лиофилизации, а также контроля препаратов при длительном хранении. Причем это можно делать только по данным флуориметрии, когда необходимы не абсолютные значения КОЕ, а данные о степени повреждения препарата от действия экстремальных факторов. Следует учесть, что для получения количественных данных (КОЕ) калибровочные кривые следует делать отдельно для каждого вида, а возможно, и штамма.

Ряд данных об особенностях строения наружных слоев оболочечного комплекса грамотрицательных бактерий удалось выявить при изучении проникновения в клетку бромистого этидия в присутствии детергентов различных классов. В частности, катионный детергент цетилтриметиламмонийбромид (ЦТАБ) разрушал мембранный аппарат клеток *E. coli*, *F. tularensis* и *Y. pestis*. У капсулообразующих штаммов *E. coli* этот процесс замедлялся и носил s-образный характер. Этот же феномен наблюдался у мутантов *E. coli* по длине цепочки липополисахарида: чем она длиннее, тем более замедлялся процесс лизиса, и s-образность процесса носила более выраженный характер. В то же время капсула *Y. pestis*, образованная F-антигеном, ускоряла процесс лизиса клеток в присутствии ЦТАБ. Неионный детергент тритон X-100 действовал на клетки *E. coli* только в присутствии ЭДТА, на *F. tularensis* – без ЭДТА, а клетки *Y. pestis* были нечувствительны к детергенту и в присутствии ЭДТА. Таким образом регистрация флуоресценции бромистого этидия в бактериальных суспензиях на фоне действия детергентов различных классов позволила исследовать особенности поверхностных структур оболочки грамотрицательных бактерий.

Кроме изучения взаимодействия бактериальных клеток с флуоресцентными зондами и метками (бромистый этидий, акридиновый оранжевый, флуоресцеин диацетат, ANS), мы исследовали и собственную флуоресценцию бактерий.

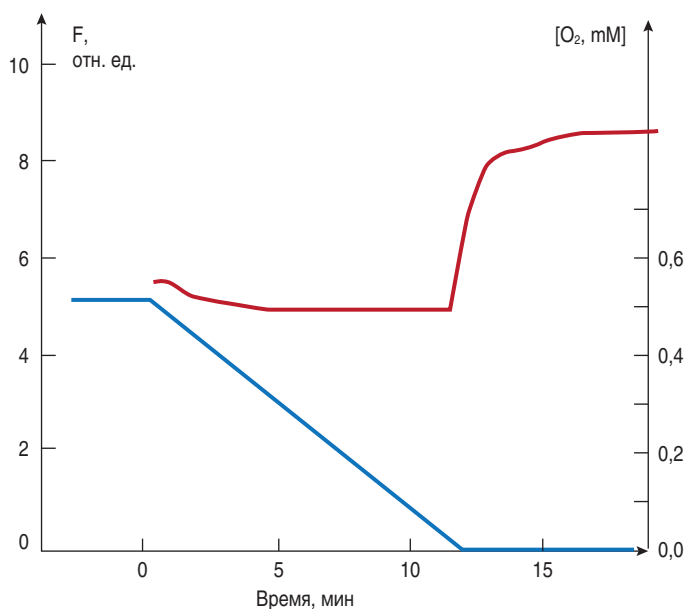
В параллельных опытах измерения концентрации кислорода в суспензиях покоящихся бактерий полярографическим методом и их флуоресценции было установлено, что в момент исчерпания кислорода в результате дыхательной активности клеток резко возрастала флуоресценция в области 420–460 нм. Спектр флуоресценции соответствовал таковому восстановленной формы никотинамид динуклеотида (NADH). Этот феномен повторялся на культурах *E. coli*,



Ю.М.Помыткин, кандидат медицинских наук, ученый секретарь (1982–2005 гг.) До переезда в Оболенск работал в Хабаровском медицинском институте (заведовал кафедрой, был деканом факультета, проректором по учебной работе. [Юбилейная книга: 75 лет Дальневосточному государственному медицинскому университету. Хабаровск: Издательство ГОУ ВПО Дальневосточный государственный медицинский университет, 2005, 326 с. ISBN 5-85797-110-1].

F. tularensis и *Y. pestis*. Отличия были лишь в динамике и соотношении интенсивностей флуоресценции в присутствии кислорода и после его исчерпания. Присутствие различных источников углерода также влияло на параметры изменения собственной флуоресценции бактериальных клеток. Эти эксперименты, выполненные мной и Т.Ю.Кудрявцевой под руководством Е.О.Пучкова, легли в основу методики измерения скорости дыхания бактерий по интенсивности их собственной флуоресценции.

Не могу не упомянуть метод рефрактометрической цитометрии, который внедрил и усовершенствовал в нашем центре к.м.н. В.Ф.Дащенко. Метод, разработанный Б.А.Фихманом, основывается на аноптральной микроскопии (разновидность фазово-контрастной микроскопии) и использовании специальной иммерсионной среды для приготовления микропрепаратов. Коэффициент преломления этой среды (желатин) подбирался близким к таковому микробной клетки. При этом в препарате на темном фоне виден лишь ярко светящийся контур клеточной стенки. Повреждение клетки или ее гибель сопровождается изменением коэффициента преломления, что сопровождается либо полным засвечиванием клетки в случае ее гибели, либо появлением ярко светящихся участков цитоплазмы у поврежденных клеток. Метод субъективен, поэтому В.Ф.Дащенко дополнил микроскоп фотометром, позволяющим измерять свечение клеток по сравнению с окружающей средой. В ходе опыта измерялась светимость нескольких сотен клеток в препарате вручную, что в конечном итоге давало возможность определить процент живых особей.



Динамика изменений флуоресценции (красная линия) и концентрации кислорода (синяя линия) в суспензии клеток *E. coli* в процессе дыхания. $\lambda_{\text{возб.}} = 340$ нм, $\lambda_{\text{рег.}} = 430$ нм. Концентрация клеток 1 мг с.в./мл.

Популяционный анализ бактериальных клеток актуален в биотехнологиях, основанных на культивировании микроорганизмов, поскольку позволяет выявлять тонкие изменения структуры клеток, что важно как при отработке регламента культивирования, так для мониторинга процесса. С использованием современных компьютерных технологий метод может быть модифицирован путем машинного анализа цифровых изображений и дальнейшей их обработки (форма клеток, коэффициенты преломления и т.д.).

Таким образом, в ГНЦ ПМБ был разработан и активно использовался в исследованиях целый арсенал инструментальных методов бесконтактного анализа структурно-функционального состояния бактерий, включая возбудителей особо опасных инфекций.

По итогам этих работ было защищено 4 кандидатских и одна докторская диссертация. Ниже представлен список основных опубликованных работ, выполненных сотрудниками института по данной тематике.

Литература

1. Пучков Е.О., Говорунов И.Г. Способ оценки жизнеспособности грамотрицательных бактерий Авторское свидетельство СССР № 903382 1982, №5 1981 г.
2. Пучков Е.О., Говорунов И.Г. Низкотемпературная консервация бактерий. Обзорная информационный материал. Консервация генетических ресурсов. Серия II. Общие вопросы микробиологической промышленности. М.: ОНТИТЭИ микробиопром; 1982, 20 с.
3. Говорунов И.Г., Косарев Н.В., Евтодиенко Ю.В., Пучков Е.О. Исследование проницаемости мембран оболочки *Escherichia coli* для бромистого этидия. Микробиология. 1982; 51(5): 731-734.
4. Пучков Е.О., Говорунов И.Г., Евтодиенко Ю.В., Косарев Н.В. Действие шока, вызванного низкой температурой, и внеклеточного образования льда на внешнюю и цитоплазматическую мембраны клеток *Escherichia coli*. Микробиология. 1983; 52(1): 136-139.

5. Пучков Е.О., Говорунов И.Г. Проблемы криоконсервации бактериальных культур. Информационный материал. Консервация генетических ресурсов. Пущино, ОНТИ НЦБИ, 1983, 23 с.
6. Говорунов И.Г. Нефелометрический и флуориметрический анализ барьерных свойств мембран *E. coli* после низкотемпературных воздействий. Автореферат дисс. ... к.б.н. Оболенск. 1984.
7. Пучков Е.О., Говорунов И.Г., Косарев Н.В., Пинчукова В.А. Комплексный анализ повреждений мембран *E. coli* после низкотемпературного анабиоза. II Всесоюзная конференция по анабиозу. Рига, 1984, с. 90-91.
8. Говорунов И.Г. Пучков Е.О. Исследование нефелометрических параметров плазмолитической реакции бактерий *Escherichia coli* K-12. Прикладная биохимия и микробиология. 1987; 23(2): 260-265.
9. Пучков Е.О., Говорунов И.Г. Повреждение мембран бактерий при низкотемпературном анабиозе. Торможение жизнедеятельности клеток. Под ред. М.Е.Бекера. Рига, 1987, с. 144-155.
10. Пучков Е.О., Косарев Н.В. Флуориметрический контроль концентрации клеток в бактериальной популяции. Всес. конференция. «Биофизика Микробных Популяций». Красноярск, 1987, с. 143.
11. Пучков Е.О., Апонин Ю.М., Ирхин А.И., Ванякин Е.Н. Анализ кинетики действия цетилтриметиламмонийбромид на мембраны капсульного варианта *E. Coli* Sa189, регистрируемой по флуоресценции бромистого этидия. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1988; 1: 8-11.
12. Говорунов И.Г. Пучков Е.О. Экспрессный метод определения жизнеспособности клеток *E. coli* K-12, подвергнутых действию низких температур. Микробиология. 1988; 57(2): 347-351.
13. Пучков Е.О. Методы определения содержания и жизнеспособности микроорганизмов. Биотехнология. 1988; 4(1): 132-142.
14. Косарев Н.В., Пучков Е.О. Определение концентрации бактерий по флуоресценции бромистого этидия. Микробиология. 1989; 58(1): 149-153.
15. Ирхин А.И., Кондрашенко Т.Н., Пучков Е.О. Чувствительность мембран клеток *E. coli* к детергентам разных классов. Микробиология. 1989; 58(2): 217-221.
16. Иванов С.А., Говорунов И.Г., Сахаров Б.В., Пучков Е.О. Влияние осмотического давления культуральной среды на клетки вакцинного штамма 15 *F. tularensis*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1990; 11: 3-6.
17. Говорунов И.Г., Кудрявцева Т.Ю., Пучков Е.О. Динамика внутрибактериальных пиридиновых нуклеотидов при переходе аэробно-анаэробия. Тезисы докладов VI Всероссийского съезда микробиологов, эпидемиологов и паразитологов. Нижний Новгород, 1991. М., 1991, Т. 2, с. 218.
18. Пучков Е.О., Пинчукова В.А., Иванов С.А. Характеристика транспорта ионов калия через мембрану бактерий вакцинной культуры *Francisella tularensis*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1991; 6: 11-13.
19. Дашенко В.Ф., Говорунов И.Г. Метод рефрактометрической циторефрактометрии для анализа жизнеспособности и гетерогенности по степени повреждения микробных популяций *Yersinia pestis*. Тезисы докладов VI Всероссийского съезда микробиологов, эпидемиологов и паразитологов. Нижний Новгород, 1991. М., 1991, Т. 2, с. 62-63.
20. Говорунов И.Г., Дашенко В.Ф. Динамика морфологических изменений клеток в процессе реактивации живой сухой чумной вакцины Всерос. конф. «Иммунология и специфическая профилактика особо опасных инфекций». г. Саратов, 21-23 сентября, 1993 г. Саратов, с. 153
21. Говорунов И.Г., Дашенко В.Ф., Благодатских А.Я. Взаимодействие бактерий *Y. pestis* и *F. tularensis* с бромистым этидием. Всерос. конф. «Иммунология и специфическая профилактика особо опасных инфекций». г. Саратов, 21-23 сентября, 1993 г. Саратов, с. 154
22. Говорунова В.А., Говорунов И.Г., Фирстова В.В., Зырина Е.В. Исследование взаимодействия бромистого этидия с клетками бактерий рода *Yersinia* в лиофилизированных/регидратированных препаратах. Проблемы особо опасных инфекций. 2012; 1(111): 54-56.