



Егорова О.В., Михеев П.В., Трухина Г.М., Илюшина Н.А.

Культурально-морфологические и биохимические свойства индикаторных культур *Salmonella typhimurium*, используемых в тесте Эймса, и их применимость для оценки качества тест-системы

ФБУН «Федеральный научный центр гигиены имени Ф.Ф. Эрисмана» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 141014, Мытищи, Россия

Введение. Тест Эймса нашёл широкое применение для изучения мутагенности химических веществ. Ввиду внедрения системы менеджмента качества в деятельность испытательных центров для совершенствования оценки качества штаммов в тест-системе *Salmonella*/микросомы изучены культурально-морфологические и биохимические свойства индикаторных культур и дана оценка их применимости как дополнительных характеристик качества тест-штаммов.

Материалы и методы. Изучение культурально-морфологических характеристик штаммов *S. typhimurium* проводили с использованием ряда коммерческих сред. Биохимические свойства культур *S. typhimurium* определяли с помощью анализатора Vitek-2.

Результаты. Исследования показали, что процедура подтверждения эталонных свойств индикаторных культур наряду с оценкой спонтанного уровня мутирования и генетических характеристик (-his фенотип, наличие либо отсутствие R-фактора, rfa- и DuvrB-мутации) может быть расширена за счёт периодической оценки биохимических свойств. Индикаторные культуры имеют большинство биохимических признаков бактерий сероварианта *Salmonella typhimurium*. Атипичными признаками по отношению к штамму дикого типа являются отрицательная реакция в тесте на выделение сероводорода, позитивная тирозинариламидазная активность, способность утилизировать 5-кето-D-глюконат, неустойчивая альфа-галактозидазная активность. Дифференциально-диагностические среды, используемые для поддержания культур сальмонелл дикого типа, не являются универсальными для роста штаммов тест-системы *Salmonella*/микросомы. При выборе сред для оценки цитотоксичности, выживаемости или стерильности необходимо руководствоваться ростовыми характеристиками бактерий тест-системы *Salmonella*/микросомы: способность к росту на селективных средах уменьшается в ряду: агар Эндо-ГРМ > SS-агар > висмут-сульфит агар > агар Плоскирева-ГРМ.

Ограничения исследования. Исследование ограничено изучением культурально-морфологических и биохимических характеристик культур *S. typhimurium*, но не *Escherichia coli*.

Заключение. Описанные культурально-морфологические признаки тест-штаммов на разных средах могут быть использованы при оценке цитотоксичности, выживаемости при выполнении исследований согласно руководству ОЭСР № 471. Применение дополнительных биохимических маркёров аутентичности и морфологических свойств индикаторных штаммов будет способствовать обеспечению качества исследований с помощью теста Эймса при консервации, воспроизводстве и использовании в рутинных исследованиях культур.

Ключевые слова: мутагенность; тест Эймса; *Salmonella typhimurium*; биохимические маркёры; культурально-морфологические свойства

Соблюдение этических стандартов. Исследование не требует представления заключения комитета по биомедицинской этике или иных документов (на русском и английском языках).

Для цитирования: Егорова О.В., Михеев П.В., Трухина Г.М., Илюшина Н.А. Культурально-морфологические и биохимические свойства индикаторных культур *Salmonella typhimurium*, используемых в тесте Эймса, и их применимость для оценки качества тест-системы. *Гигиена и санитария*. 2023; 102(6): 605–611. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2023-102-6-605-611> <https://elibrary.ru/fhxcqt>

Для корреспонденции: Егорова Ольга Валерьевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. отд. генетической токсикологии, ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, 141014, Мытищи. E-mail: egorovaov@fferisman.ru

Участие авторов: Егорова О.В. – концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, написание текста; Михеев П.В. – сбор и обработка материала; Трухина Г.М. – обработка материала; редактирование текста; Илюшина Н.А. – анализ материалов, написание текста. Все соавторы – утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила: 23.03.2023 / Принята к печати: 07.06.2023 / Опубликована: 30.07.2023

Olga V. Egorova, Pavel V. Mikheev, Galina M. Trukhina, Nataliya A. Ilyushina

Cultural, morphological and biochemical properties of *Salmonella typhimurium* indicator bacteria used in the Ames test and their applicability for the assessment of the test system quality

Federal Scientific Center of Hygiene named after F.F. Erisman of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Mytishchi, 141014, Russian Federation

Introduction. The Ames test has been widely used to study the mutagenicity of chemicals. In view of the implementation of a quality management system in the test facilities, the cultural, morphological and biochemical properties of strains used in the *Salmonella*/microsome test system were studied. An assessment of their applicability as additional characteristics of quality of the tester strain was made.

Materials and methods. The study of cultural and morphological characteristics of *S. typhimurium* strains was carried out using the commercial media. The biochemical properties of *S. typhimurium* cultures were evaluated using a Vitek-2 system.

Results. Studies have shown that the procedure of marker verification for confirming the reference properties of tester strains, in addition to evaluation of the spontaneous mutation level and phenotypic characteristics (-his phenotype, the presence or absence of the R-factor plasmids, rfa- and DuvrB mutations), can be extended by periodically assessing their biochemical properties. Most of the biochemical characteristics of bacteria of the *Salmonella typhimurium* serovar are inherent for tester strains. Compared to the wild-type bacteria atypical features of tester strains are a negative reaction in the hydrogen sulfide production test,

positive activity of tyrosine arylamidase, the ability to utilize 5-keto-D-gluconate, unstable activity of alpha-galactosidase. Differential selective media used to maintain wild-type *Salmonella* cultures are not universal for the growth of strains of the *Salmonella*/microsome test system. When choosing media for cytotoxicity, survival, or sterility assessment, it is necessary to take into consideration the growth characteristics of the *Salmonella* tester strains on different media: the ability to grow on selective media decreases in the series of Endo-agar > *Salmonella* Shigella -agar > Bismuth-sulfite agar > Ploskirev's agar.

Limitations. The research is limited to the study of cultural, morphological and biochemical characteristics of *S. typhimurium*, but not *Escherichia coli*.

Conclusion. The described cultural and morphological properties of tested strains on different media can be used to assess cytotoxicity/survival of treated cultures performing studies according to OECD 471. The use of additional biochemical markers of authenticity and morphological properties of tester strains will help to ensure the quality of studies using the Ames test in the processes of conservation, reproduction, and routine testing.

Keywords: mutagenicity; the Ames test; *Salmonella typhimurium*; biochemical markers; cultural and morphological characteristic

Compliance with ethical standards. The study does not need the approval of the biomedical ethics committee or other documents.

For citation: Egorova O.V., Mikheev P.V., Ilyushina N.A., Ilyushina N.A. Cultural morphological and biochemical properties of *Salmonella typhimurium* indicator bacteria used in the Ames test and their applicability for the assessment of the test system quality. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2023; 102(6): 605–611. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2023-102-6-605-611> <https://elibrary.ru/fxhcqt> (In Russ.)

For correspondence: Olga V. Egorova, MD, PhD, senior researcher of the department of genetic toxicology, Federal Scientific Center of Hygiene named after F.F. Erisman of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Mytishchi, 141014, Russian Federation. E-mail: egorovaov@ferisman.ru

Information about the authors:

Egorova O.V., <https://orcid.org/0000-0003-4748-8771> Mikheev P.V., <https://orcid.org/0000-0002-3376-0677>

Trukhina G.M., <https://orcid.org/0000-0001-9955-7447> Ilyushina N.A., <https://orcid.org/0000-0001-9122-9465>

Contribution: Egorova O.V. – the concept and design of the study, the collection and processing of material, writing the text; Mikheev P.V. – collection and processing of material; Ilyushina N.A. – analysis of materials, writing the text. All authors are responsible for the integrity of all parts of the manuscript and approval of the manuscript final version

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement. The study had no sponsorship.

Received: March 23, 2023 / Accepted: June 7, 2023 / Published: July 30, 2023

Введение

Внимание исследователей при изучении многочисленных серотипов бактерий рода *Salmonella*, как правило, обусловлено патогенными свойствами и сфокусировано на совершенствовании методов выделения бактерий, их идентификации, изучении культурально-морфологических, биохимических и антигенных свойств [1]. *Salmonella typhimurium* не только является распространённым кишечным патогеном, который может инфицировать людей и животных¹. Наряду с этим штамм *S. typhimurium* LT2 стал родоначальником панели авирулентных аукоотрофных индикаторных культур, используемых для скрининговой оценки мутагенных свойств химических соединений в тесте Эймса (метод оценки обратных генных мутаций на бактериях, тест-система *Salmonella*/микросомы)² [2–4].

В основе метода лежит способность химических веществ индуцировать обратные генные мутации у бактерий в гистидиновом опероне вследствие мутагенной или промутагенной активности тестируемого вещества. Помимо мутаций в гистидиновом опероне для повышения чувствительности штаммов к действию мутагенов геном индикаторных культур подвергся дополнительным изменениям. Делеция в галактозном опероне и мутация *rfa* способствовали увеличению проницаемости клеточной стенки бактерий за счёт нарушения её липосахаридной структуры и, как следствие, потере патогенных свойств штаммов. В результате делеции *gal* также были затронуты гены эксцизионной репарации *uvrB* и синтеза биотина *bio* (за исключением TA102). Ввиду подавления SOS-репарации у сальмонелл в некоторые индикаторные культуры была введена сконструированная плазмида pKM101, которая наряду с маркером антибиотикорезистентности Arg содержала локус *misAB*, сходный по своим функциям с *umuDC*, что привело к увеличению восприимчивости бактерий к действию генотоксиканта за счёт повышения эффективности мутационных процессов. Использование штамма TA102, несущего плазмиду pQA1, позволило выявлять мутагены, вызы-

вающие перекрёстные сшивки. Тестирование химических веществ с использованием всех рекомендуемых штаммов индикаторных культур в случае обнаружения позитивной активности соединения позволяет установить тип индуцируемых мутаций: замены пар оснований или сдвига рамки считывания [5]. В настоящее время метод оценки обратных генных мутаций на бактериях нашёл широкое применение при разработке молекул-кандидатов лекарственных средств, пестицидов, ветеринарных препаратов и др. в скрининговых и регистрационных целях^{3,4,5,6,7,8,9,10} [6–9]. Ввиду повсеместного внедрения системы менеджмента качества в деятельность испытательных центров подходы к обеспечению компетентности испытательной лаборатории, использующей в своей практике тест на индукцию точковых мутаций у бактерий, привлекают особое внимание исследователей [10, 11]. Подтверждение эталонных свойств индикаторных культур является одним из немаловажных аспектов обеспечения качества исследований на мутагенность с помощью теста Эймса [12, 13]. Традиционно стандартная процедура проверки индикаторных культур включает оценку спонтанного фона мутирования и

³ Методические указания МУ 1.2.3364–16 «Оценка мутагенной активности пестицидов». М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2016. 49 с.

⁴ Методические указания МУ 1.2.2634–10 «Микробиологическая и молекулярно-генетическая оценка воздействия наноматериалов на представителей микробиоценоза».

⁵ Приказ Росрыболовства от 04.08.2009 г. № 695 (ред. от 22.12.2016 г.) об утверждении Методических указаний по разработке нормативов качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения, в том числе нормативов предельно допустимых концентраций вредных веществ в водах водных объектов рыбохозяйственного значения.

⁶ Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.

⁷ ГОСТ ISO 10993-3-2018 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 3. Исследования генотоксичности, канцерогенности и токсического действия на репродуктивную функцию.

⁸ ГОСТ ISO/TR 10993-33-2018. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 33. Руководство по испытаниям на генотоксичность. Дополнение к ISO 10993-3.

⁹ ГОСТ Р 57130–2016 «Лекарственные средства для медицинского применения. Исследование генотоксичности и интерпретация полученных данных».

¹⁰ ISO 11350:2012 Качество воды. Определение генотоксичности воды и сточных вод. Флукуационный тест с использованием бактерий сальмонеллы и микросомы (Флукуационный тест Эймса).

¹ МУ 4.2.2723–10. Лабораторная диагностика сальмонеллёзов, обнаружение сальмонелл в пищевых продуктах и объектах окружающей среды.

² ГОСТ 32376–2013. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Метод оценки обратных мутаций на бактериях.

генетических характеристик, присущих каждому штамму: ауксотрофности по гистидину, наличие либо отсутствие плазмид R-фактора, присутствие специфических мутаций *rfa* и *uvrB* (или *uvrA*) [4, 13, 14].

Для совершенствования оценки качества штаммов в тест-системе *Salmonella*/микросомы нами проведено изучение культурально-морфологических и биохимических свойств индикаторных культур *S. typhimurium* и дана оценка их применимости как дополнительных характеристик качества тест-штаммов, используемых в тесте Эймса.

Материалы и методы

Референтный штамм *S. typhimurium* 79 (В-4376) получен из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск».

Индикаторные штаммы *S. typhimurium* В-5291 (ТА97), В-5294 (ТА98), В-5303 (ТА1535), В-5300 (ТА100), В-5393 (ТА102) получены в лиофилизированном виде из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ).

После генетического анализа индикаторных штаммов готовили серию эталонных и рабочих культур, которые поддерживали при температуре минус 75 ± 5 °С с использованием диметилсульфоксида в качестве криоконсерванта (1–2%). Генетический анализ штаммов из банка рабочих культур проводили с периодичностью 1 раз в 1–2 мес [14]. Изучение культурально-морфологических характеристик штаммов *S. typhimurium* проводили с использованием готовых коммерческих сред: ГМФ-агар (производитель ЗАО НИЦФ, Санкт-Петербург); ГРМ-агар, Эндо-ГРМ-агар, висмут-сульфит агар, агар Плоскирева-ГРМ, SS-агар (Сальмонелла Шигелла агар, производитель ФБУН ГНЦ МПБ, Оболенск). LB-среду готовили по прописи согласно паспорту штамма: 10 г/л пептона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л NaCl, 15 г/л агара, дистиллированная вода. Gm-среда: 2%-й водный агар (750 мл), солевой концентрат (рН 7,2–7,4) (40 мл), 20%-й раствор глюкозы (20 мл), 1%-й раствор MgSO₄ (12 мл), 0,2%-й биотин (2 мл), 0,5%-й гистидин (8 мл). Солевой концентрат: C₆H₅O₇Na₃ · H₂O – 10 г/л; K₂HPO₄ · 3H₂O – 210 г/л; KH₂PO₄ – 90 г/л; аммоний серноокислый (NH₄)₂SO₄ – 20 г/л; дистиллированная вода.

Перед началом эксперимента аликвоту рабочей культуры после оттаивания при комнатной температуре вносили в 15–25 мл жидкой LB-среды и инкубировали в течение 16–17 ч при температуре плюс 37 ± 1 °С до плотности приблизительно 10^9 /мл. Готовили серию разведений культуральной жидкости, после чего 100 мкл из 4-го, 5-го и 6-го разведений высевали поверхностным способом на чашки Петри со средой в 2–3 параллельных повторах с последующей инкубацией при 37 ± 1 °С в течение 24 ч (ГМФ-агар, ГРМ-агар, Эндо-ГРМ, LB-среда) или 48 ч (висмут-сульфит агар, SS-агар, агар Плоскирева, GМ-среда). Морфологию колоний исследовали под стереоскопическим микроскопом МСП-2.

Биохимические свойства выросших на ГРМ-агаре индикаторных культур *S. typhimurium* не старше 18–24 ч исследовали с помощью автоматизированной системы Vitek-2 (BioMérieux, Франция) согласно инструкции производителя с использованием идентификационных GN-карт, предназначенных для автоматической идентификации клинически значимых ферментирующих и неферментирующих грамотрицательных палочек.

Определение мутности суспензии проводили с помощью денситометра DEN-1В (BioSan, Латвия) и стандартов мутности 0,5; 1; 2; 3; 4 единиц Мак-Фарланда (Hardy Diagnostics Inc, США).

Результаты

На LB- и Gm-средах наблюдали формирование округлых выпуклых слегка бежевых непрозрачных колоний диаметром 2–3 мм с однородной структурой и блестящей гладкой поверхностью. Колонии имели ровный край (ТА100, ТА102,

ТА98, ТА97) или приподнятый центр и валик по краям (ТА1535). Морфологические свойства индикаторных культур на среде ГРМ были аналогичны их характеристикам на LB-агаре за исключением размера колоний, диаметр которых составлял 3–4 мм. Ауксотрофные штаммы *S. typhimurium* на среде ГМФ через 24 ч роста формировали колонии, сходные по морфологическими параметрам с наблюдаемыми на ГРМ-агаре, но сероватого оттенка (все штаммы), а также мелкозернистой структуры в случае ТА1535.

Пассаж на среду Эндо-ГРМ сопровождался формированием округлых выпуклых непрозрачных колоний темно-пурпурного цвета без металлического блеска, имевших диаметр 2–3 мм, однородную структуру и гладкую поверхность. Колонии имели либо ровный край (ТА100, ТА1535), либо приподнятый центр и валик по краям (ТА98, ТА97, ТА102). На среде Плоскирева индикаторные культуры образовывали округлые сферические непрозрачные слегка бежевые колонии диаметром 2–3 мм однородной структуры, имевшие ровный край и блестящую гладкую поверхность. Для культур ТА98 и ТА1535 был характерен слабый рост. При высеве культуральной жидкости без разведения было отмечено формирование единичных колоний, а у штамма ТА97 наблюдали отсутствие бактериального газона на данной среде. При росте на вышеперечисленных средах колонии не выделяли пигмента в среду. Морфология колоний на висмут-сульфит агаре характеризовалась следующими признаками: колонии округлые с приподнятым центром и валиком по краям (ТА100, ТА102) или выпуклые с ровным краем (ТА98), темно-зелёные, диаметром 1–3 мм, с гладкой поверхностью без металлического блеска, непрозрачные с однородной структурой и ровным краем. Среда под колонией была слегка прокрашена. Для культур ТА97 и ТА1535 отмечено полное отсутствие роста при высеве культуральной жидкости без разведения.

При росте на SS-агаре наблюдали полиморфизм морфологических признаков среди изучаемых штаммов. Индикаторные культуры ТА100, ТА1535, ТА98 и ТА102 формировали непрозрачные округлые бесцветные колонии мелкозернистой структуры с приподнятым центром и радиальной складчатостью края. Для штамма ТА97 характерным признаком являлось образование округлых бесцветных выпуклых колоний с ровным краем и блестящей гладкой поверхностью. Диаметр колоний достигал 4–5 мм, среда под колонией была слегка прокрашена (кроме ТА97). На SS-агаре штамм ТА1535 формировал единичные колонии. На всех средах колонии легко снимались петлёй с поверхности агара и имели мягкую консистенцию.

Изучение биохимических свойств исследуемых штаммов показало, что бактерии ферментируют D-глюкозу, D-мальтозу (кроме ТА97), D-маннозу, D-тагатозу, D-трегалозу, D-маннит, D-сорбит, кумарат, цитрат натрия, подщелачивают сукцинат (кроме ТА97 и ТА98), L-лактат (кроме ТА97), сбраживают глюкозу (кроме ТА97), не ассимилируют L-малат, L-лактат, L-гистидин, L-арабит, адонитол. Бактерии не обладают устойчивостью к вибриостатическому агенту O/129 и не выделяют сероводорода. Не обнаружено ферментативной активности в тестах на утилизацию малоната, палатинозы, D-целлобиозы, сахарозы. Тест Элмана отрицательный. Для индикаторных культур была характерна отрицательная реакция на идентификационный субстрат Ala-Phe-Pro-ариламидазы, L-пролиналидамидазы, глициналидамидазы, Glu-Gly-Arg-ариламидазы, L-пирролидин-ариламидазы, глутамилариламидазы рНА, уреазы, бета-аланилариламидазы рНА, бета-N-ацетил-глюкозаминидазы, бета-N-ацетилгалактозаминидазы, альфа-глюкозидазы, бета-глюкозидазы, бета-ксилозидазы, бета-глюкуронидазы, бета-галактозидазы, липазы, гамма-глутамил-трансферазы. В отношении субстратов таких ферментов, как орнитин-декарбоксилаза, лизиндекарбоксилаза, фосфатаза, тирозинариламидаза, выявлена позитивная активность. Для 5-кето-D-глюконата и субстрата альфа-галактозидазы в случае некоторых тест-штаммов выявлена неустойчивая активность (см. таблицу).

Биохимические свойства индикаторных культур *S. typhimurium* на основании данных автоматизированной системы Vitek-2*
Biochemical properties of tester strains of *S. typhimurium* obtained with the automated system Vitek-2*

Признак Characteristic	Обозначение Abbreviation	Штамм / Strains						
		<i>S. typhimurium</i> 79	TA100	TA1535	TA102	TA98	TA97	
Гидролазная активность (амидазы) Hydrolase activity (amidases)	Ала-Фе-Про-ариламидаза / Ala-Phe-Pro-arylamidase	APPA	–	–	–	–	–	–
	Л-пролинариламидаза / L-prolin arylamidase	ProA	–	–	–	–	–	–
	Глицинариламидаза / Glycine arylamidase	GlyA	–	–	–	–	–	–
	Глу-Гли-Арг-ариламидаза / Glu-Gly-Arg-arylamidase	GGAA	–	–	–	–	–	–
	Л-пирролидон-ариламидаза / L-pyrrolidone-arylamidase	PyrA	–	–	–	–	–	–
	Глютамилариламидаза pNA / Glutamyl arylamidase pNA	AGLTr	–	–	–	–	–	–
	Тирозинариламидаза / Tyrosine arylamidase	TyrA	–	+	+	+	+	+
	Уреаза / Urease	URE	–/–**	–	–	–	–	–
	Бета-аланинариламидаза pNA pNA beta-alaninarilamidase	BAlap	–	–	–	–	–	–
	Бета-N-ацетил-глюкозаминидаза Beta-N-acetyl-glucosaminidase	BNAG	–	–	–	–	–	–
Бета-N-ацетилгалактозаминидаза Beta-N-acetyl-galactosaminidase	NAGA	–	–	–	–	–	–	
Гидролазная активность (гликозидазы) Hydrolase activity (glycosidases)	Альфа-глюкозидаза / Alpha-glucosidase	AGLU	–	–	–	–	–	–
	Бета-глюкозидаза / Beta-glucosidase	BGLU	–	–	–	–	–	–
	Бета-ксилозидаза / Beta-xylosidase	BXYL	–/–**	–	–	–	–	–
	Бета-глюкуронидазам / Beta-glucuronidase	BGUR	–/–**	–	–	–	–	–
	Альфа-галактозидазам / Alpha-galactosidase	AGAL	+	–/(–)/+/-	+/-/+/-	(–)/(+)/+/-	+/-/+/-	+
Бета-галактозидаза / Beta-galactosidase	BGAL	–/–**	–	–	–	–	–	
Лиазы Lyases	Орнитидин-декарбоксилаза / Ornithidine decarboxylase	ODC	+/+**	+	+	+	+	+
	Лизиндекарбоксилазам / Lysine decarboxylase	LDC	+/+**	+	+	+	+	+
	Липазам / Lipase	LIP	–	–	–	–	–	–
	Фосфатазам / Phosphatase	PHOS	+	(–)/+/-/+	+	+	+	+
Сахаролитическая активность (моносахариды) Saccharolytic activity (monosaccharides)	D-глюкоза / D-glucose	dGLU	+/+**	+	+	+	+	+
	D-манноза / D-mannose	dMNE	+	+	+	+	+	+
	D-тагатоza / D-tagatose	dTAG	+	+	+	+	+	+
	D-трегалоза / D-trehalose	dTRE	+/+**	+	+	+	+	+
	Сбраживание глюкозы / Glucose fermentation	OFF	+/+**	+	+	+	+	–
Сахаролитическая активность (дисахариды) Saccharolytic activity (disaccharides)	D-мальтоза / D-maltose	dMAL	+	+	+	+	+	–
	Палатиноза / Palatinosa	PLE	–	–	–	–	–	–
	Сахароза / Sucrose	SAC	–/–**	–	–	–	–	–
	D-целлобиоза / D-cellobiose	dCEL	–/–**	–	–	–	–	–
Сахаролитическая активность (многоатомные спирты) Saccharolytic activity (polyhydric alcohols)	Адонитол / Adonitol	ADO	–/–**	–	–	–	–	–
	L-арабит / L-arabitol	IARL	–/–**	–	–	–	–	–
	D-маннит / D-mannitol	dMAN	+/+**	+	+	+	+	+
	D-сорбит / D-sorbitol	dSOR	+/+**	+	+	+	+	+
Метаболизм карбоновых кислот Metabolism of carboxylic acids	L-лактат, подщелачивание / L-lactate, alkalization	ILATk	+	+	+	+	+	–
	L-лактат, ассимиляция / L-lactate, assimilation	ILATa	–	–	–	–	–	–
	L-малат, ассимиляция / L-malate, assimilation	IMLTa	–	–	–	–	–	–
	Малонат / Malonat	MNT	–/–**	–	–	–	–	–
	Сукцинат, подщелачивание / Succinate, alkalization	SUCT	+	+	+	+	–	–
	Цитрат натрия / Sodium citrate	CIT	+/+**	+	+	+	+	+
Метаболизм пептидов Peptide metabolism	5-кето-D-глюконат / 5-keto-D-gluconate	5KG	–	+/(+)/+/-	+/-/+/-	(+)/+/-	–	+
	Кумарат / Kumarat	CMT	+	+	+	+	+	+
	L-гистидин, ассимиляция / L-histidine, assimilation	IHISa	–	–	–	–	–	–
	Выделение H ₂ S / H ₂ S production	H ₂ S	+/+**	–	–	–	–	–
	Эллман / Ellman	ELLM	–	–	–	–	–	–
	Гамма-глутамил-трансфераза Gamma-glutamyl transferase	GGT	–	–	–	–	–	–
	Устойчивость Resistance	Устойчивость к O/129 (вибриостат. агенту) Resistance to O/129	O129R	+	–	–	–	–

Примечание. * Для каждого штамма оценку биохимических свойств проводили в 3–4 независимых экспериментах. Данные для отдельных экспериментов приведены только в случае отличающихся результатов; (–) – слабоотрицательная реакция, (+) – слабоположительная реакция; ** – согласно данным Vitek-2/согласно паспорту штамма.

Note. * The assessment of biochemical properties was carried out in 3–4 independent experiments for each strain. Data for individual experiments are shown only in case of discrepant results; (–) – weakly negative reaction, (+) – weakly positive reaction; ** – according to Vitek-2 data/according to strain passport.

Все индикаторные культуры были идентифицированы как *Salmonella ser. typhimurium* с вероятностью 96–99%.

Обсуждение

Общими отличительными биохимическими признаками бактерий рода *Salmonella* является их способность разлагать маннит, рамнозу, ксилозу, трегалозу, арабинозу, мальтозу, дульцит, сорбит, образовывать газ на среде с глюкозой (за исключением *S. typhi*). Сальмонеллы – оксидазонегативные, позитивные по каталазе, метиловому красному и цитрату микроорганизмы. Не расщепляют лактозу, сахарозу, мочевины, не образуют индол, ацетоин, не разжижают желатин и не свёртывают молоко [15].

Характерным свойством индикаторных бактерий *S. typhimurium*, используемых в тесте Эймса, является аукоотрофность по гистидину вследствие наличия мутаций в разных сайтах гистидинового оперона у разных штаммов. Например, замена пар оснований в локусе *hisG46* у TA1535 и TA100 затронула первый фермент биосинтеза гистидина – фосфорибозил-АТФ-пирофосфорилазу, а мутация по типу сдвига рамки считывания в локусе *hisD3052* у TA98 повлияла на активность последнего фермента катаболизма гистидина – гистидинолдегидрогеназу [2]. Более обширная делеция, охватывающая сразу несколько оперонов *gal*, *bio*, *uvrB*, привела к неспособности синтезировать галактозу, биотин и нарушению работы системы эксцизионной репарации (за исключением TA102). Штаммы, дефектные по *uvrB*, были получены в результате возникшей резистентности к хлорату за счёт мутации в гене нитрат-редуктазы, катализирующей восстановления хлората до хлорита [5].

Мутация *rfa* наряду с *Dgal* опосредовала нарушение синтеза ферментов, ответственных за формирование полисахаридных цепей, определяющих антигенную специфичность клетки.

Сопоставление биохимических маркёров аукоотрофных штаммов и *S. typhimurium* 79, полученных с помощью автоматического анализатора, с учётом литературных данных показало, что в большинстве случаев авирулентные культуры имели типичные биохимические свойства, присущие референтной культуре. Как и следовало ожидать, в отличие от штамма *S. typhimurium* 79 индикаторные культуры были неустойчивы к вибриостатическому агенту O/129 (см. таблицу). Кроме того, согласно данным, полученным на анализаторе Vitek 2, аукоотрофным бактериям была присуща отрицательная реакция в тесте на выделение сероводорода. Тем не менее на висмут-сульфит агаре, дифференцирующее действие которого основано на реакции образования сульфида висмута вследствие выделения H_2S бактериями, наблюдали формирование тёмно-зелёных колоний TA100, TA102 и TA98 со слабым окрашиванием среды под ними.

Поскольку сульфид водорода является конечным продуктом разложения серосодержащих аминокислот цистина, цистеина и метионина, наблюдаемые эффекты могут быть связаны с низкой активностью десульфуразы (цистиназы) у индикаторных культур. В работах [16, 17] также сообщалось об отрицательной реакции на выделение сероводорода у большинства аукоотрофных сальмонелл, используемых в тесте Эймса. Авторы предполагают, что потеря способности образовывать газ на средах с тиосульфатом и глюкозой связана с отсутствием триметиламиноксид-редуктазы. Изменение биохимического профиля, присущего *S. typhimurium* дикого типа, в отношении реакции на выделение сероводорода, а также утилизации рамнозы и цитрата натрия показано в работе [18]. При изучении биохимических свойств штаммов сальмонелл (музейного и выделенных из проб воды р. Оки) отмечали потерю способности к образованию сероводорода при длительном обитании в модельной водной среде: через 2 мес при температуре плюс 10 °С и через 6 мес при температуре плюс 26 °С. Отсутствие ферментативной активности сальмонелл в отношении рамнозы и цитрата натрия наблюдали через одну неделю после эксперимента при

температуре плюс 10 °С и начиная со второго месяца при температуре плюс 26 °С. Наблюдаемые изменения авторы связывают с адаптационными процессами при выживании в неблагоприятной среде.

У всех тест-штаммов выявлена позитивная активность в отношении субстрата тирозинариламидазы, что, возможно, свидетельствует об их способности к катаболизму определённой группы белков. Тирозин, образуемый по шикиматному пути метаболизма, играет важную роль в синтезе многих ферментов, поскольку является субстратом для протеинкиназ, осуществляющих фосфорилирование в процессе биосинтеза белков и регуляции их активности [19].

При изучении биохимических свойств 321 изолята бактерий, выделенных из пещеры Parsik на северо-западе Турции, обнаружено, что большинству грамотрицательных (85,52%), грамположительных (65,97%) и грамположительных спорообразующих (82,35%) палочек была присуща тирозинариламидазная активность. По мнению авторов, это указывает на значимую роль данной аминокислоты в микробном метаболизме [20].

Согласно результатам, полученным с помощью биохимического анализатора, ещё одним отличительным маркёром аукоотрофных сальмонелл (за исключением TA98), является их способность утилизировать 5-кето-D-глюконат по сравнению с коллекционным штаммом *S. typhimurium* 79. 5-кето-D-глюконат представляет собой промежуточный метаболит конверсии идионовой кислоты до глюконовой кислоты, последующее фосфорилирование которой приводит к образованию 6-фосфоглюконата, подвергающемуся метаболизму по пути Энтнера – Дудорова [21]. Также у ряда индикаторных культур в отличие от патогенного штамма наблюдалась неустойчивая активность альфа-галактозидазы, которая катализирует реакцию отщепления концевых остатков α -D-галактозы от α -D-галактозидов.

Необходимо подчеркнуть, что для некоторых субстратов отмечена вариабельность реакции у аукоотрофных штаммов. Например, TA97 не сбрасывал глюкозу, не утилизировал мальтозу, не подщелачивал L-лактат, сукцинат. Штамм TA98 характеризовался отсутствием реакции на подщелачивание сукцината и утилизацию 5-кето-D-глюконата.

Отличия в биохимическом профиле индикаторных штаммов, используемых в тесте Эймса, описаны в работе Busch с соавт., в частности в отношении способности сальмонелл использовать в качестве источника углерода и энергии арабинозу, мелибиозу, цитрат натрия [16]. Кроме того, сообщалось о чувствительности культуры TA97 к концентрации глюкозы в составе минимального селективного агара: она не должна превышать 2% [22], что, возможно, обусловлено сахаролитической активностью этого штамма.

Ростовые характеристики индикаторных культур на высокоселективных средах также отличались. На висмут-сульфит агаре, SS-агаре, агаре Плоскирева такие индикаторные культуры, как TA97, TA98 и TA1535, характеризовались слабым ростом в отличие от TA100 и TA102. Например, на SS-агаре наблюдали формирование единичных колоний TA1535, тогда как остальные штаммы образовывали сплошной газон при высеве культуральной жидкости без разведения. Среда Плоскирева, которая наряду с бриллиантовым зелёным и желчью содержит в отличие от SS-агара йод, обеспечивала хороший рост только двух аукоотрофных штаммов – TA100 и TA102. Для культур TA98 и TA1535 было характерно образование единичных колоний (при высеве культуральной жидкости без разведения), для TA97 – полное отсутствие бактериального газона. На висмут-сульфит агаре отмечали полное отсутствие колоний TA1535 и TA97 при высеве культуральной жидкости без разведения, что, возможно, связано с ингибирующим действием бриллиантового зелёного, присутствующего в среде в высокой концентрации: 0,015 г/л в сравнении с 0,00033 г/л в составе SS-агара.

Таким образом, высокоселективные среды, используемые при получении культуры сальмонелл дикого типа, не являются универсальными для всех индикаторных штаммов,

что, вероятно, обусловлено подавляющим действием компонентов среды: бриллиантового зелёного, желчи и йода. При этом наиболее чувствительной оказалась культура ТА1535. Необходимо отметить, что у штамма ТА100, который был получен из ТА1535 путём интродукции плазмиды рКМ101, отмечали хороший рост на всех высокоселективных средах.

В настоящее время в панели микроорганизмов рода *Salmonella*, применяемых в тесте Эймса, насчитывают несколько линий с разными мутациями в гистидиновом (*hisG46*, *hisD3052*, *hisC3076*, *hisD6610*, *hisG428*, *hisO1242*) и *uvrB* оперонах. С помощью технологии ДНК-микрочипов охарактеризована делеция *uvrB* у штаммов ТА97, ТА104, ТА100, ТА1537 и ТА98, результатом которой явилась потеря 0,3; 0,3; 1; 1,9 и 2,6% генома бактерий соответственно. *ΔuvrB*-мутация привела к утрате 47 генов (размером 50 т. п. н.) у ТА100, 15 генов (16 т. п. н.) у ТА97 и 119 генов (125 т. п. н.) у ТА98. Кроме того, у ТА97 и ТА104 была обнаружена идентичная делеция трёх генов вне *uvrB*-оперонов. Утраченные последовательности генома включают ряд открытых рамок считывания неустановленной функции и гены биосинтеза кофактора молибдена *moaABCDE* (у всех штаммов); *mfdA* и *mdaA*, кодирующие поликарбонатную транслоказу и кислород-чувствительную нитроредуктазу (у ТА98); *dps* и *yliJ*, кодирующие ДНК-связывающий белок и глутатион-S-трансферазу (у ТА1537 и ТА98); *dinG*, кодирующий фермент репарации под контролем белка-репрессора LexA и *rhlE*, кодирующий АТФ-зависимую РНК-геликазу (отсутствующие у ТА100, ТА1537 и ТА98). Штаммы ТА97 и ТА104 в отличие от других индикаторных культур характеризовались наличием интактного галактозного оперона, следовательно, фенотип *Dgal* у этих штаммов опосредован, по мнению авторов, более трудноуловимой геномной вариацией [23]. Наличие устойчивой позитивной активности альфа-галактозидазы у ТА97, обнаруженной с помощью биохимического анализатора, согласуется с данными об интактном галактозном опероне у этой культуры, описанными выше. В работе Matsumura и соавт. при использовании высокопроизводительного секвенирования генома также показано, что делеция *uvrB* сопровождается утратой большего участка генома у ТА98 по сравнению с ТА100 и, следовательно, приводит к более выраженным нарушениям структуры клеточной стенки [24].

В свете имеющейся информации очевидно, что отличительные биохимические маркёры у разных тест-культур опосредованы генетически детерминированными особенностями, привнесёнными в ходе получения ауксотрофных штаммов. Возможно, наблюдаемые изменения в биохимическом профиле авирулентных культур по сравнению с диким типом являются результатом внесённых в хромосомную ДНК мутаций, затрагивающих биосинтез гистидина (*-his* фенотип) и формирование клеточной стенки бактерий (*rfa*, *Dgal*), что могло привести к изменению метаболизма веществ.

Ограничение исследования. Исследование ограничено изучением культурально-морфологических и биохимических характеристик культур *S. typhimurium*, но не *Escherichia coli*.

Заключение

Исследования, посвящённые изучению культурально-морфологических и биохимических характеристик тест-штаммов и установлению их биохимических маркёров аутентичности, показали, что процедура подтверждения эталонных свойств индикаторных культур тест-системы *Salmonella*/микросомы наряду с оценкой спонтанного фона мутирования и генетических характеристик (*-his* фенотип, наличие либо отсутствие плазмид R-фактора, *rfa*- и *ΔuvrB*-мутации) может быть расширена за счёт периодической оценки их биохимических свойств.

Индикаторным культурам присущи такие отличительные биохимические признаки бактерий серологического варианта *Salmonella typhimurium*, как способность разлагать глюкозу, трегалозу, мальтозу, маннит, арабит, сорбит, декарбоксилировать лизин. Цитрат-позитивные микроорганизмы не расщепляют лактозу, сахарозу, мочевины, малонат. Атипичными признаками по отношению к штамму *Salmonella typhimurium* дикого типа являются отрицательная реакция в тесте на выделение сероводорода, позитивная тирозинариламидная активность, способность утилизировать 5-кето-D-глюконат, неустойчивая альфа-галактозидазная активность, отсутствие резистентности к вибриостатическому агенту O/129.

Дифференциально-диагностические среды, используемые для поддержания культур сальмонелл дикого типа, не универсальны для роста всех штаммов тест-системы *Salmonella*/микросомы, поэтому при выборе сред для оценки цитотоксичности, выживаемости согласно [13] или стерильности [18] необходимо руководствоваться ростовыми характеристиками индикаторных бактерий. Способность к росту на селективных средах уменьшается в ряду: агар Эндо-ГРМ (формирование обильного газа на всех 5 штаммов) > SS-агар (4 штамма) > висмут-сульфит агар (3 штамма) > агар Плоскирева-ГРМ (2 штамма).

Описанные в работе культурально-морфологические признаки колоний индикаторных бактерий на разных средах могут быть использованы при оценке цитотоксичности, выживаемости в предварительном эксперименте при выполнении исследований согласно руководству ОЭСР № 471 или ГОСТ 32376–2013 и ГОСТ ISO 10993-3–2018.

По нашему мнению, использование дополнительных биохимических маркёров аутентичности и морфологических свойств при проверке свойств индикаторных штаммов будет способствовать обеспечению качества исследований на мутагенность с помощью теста Эймса, в том числе при консервации, воспроизводстве и использовании в рутинных исследованиях постоянных и рабочих культур.

Литература

(п.п. 2–10, 12–14, 16, 17, 19–24 см. References)

1. Чугунова Е.О., Татарникова Н.А., Прохорова Т.С. *Разработка ускоренного способа и конструирование питательной среды для выделения сальмонелл из пищевых продуктов*. Пермь: Прокрост; 2017.
11. Егорова О.В. К процедуре подтверждения компетентности лаборатории, проводящей исследования на мутагенность с использованием теста Эймса. *Токсикологический вестник*. 2021; 29(4): 4–13. <https://doi.org/10.36946/0869-7922-2021-29-4-4-13> <https://elibrary.ru/dpghdx>
15. Андрусевич А.С., Тяпша Ю.И., Дубаневич О.В., Стрельченя И.И. Биохимические свойства музейных штаммов *Salmonella dublin*, *Salmonella cholerae suis*, *Salmonella typhimurium*. *Эпизоотология, иммунология, фармакология и санитария*. 2020; (1): 39–44. <https://elibrary.ru/gxlrwd>
18. Павлова И.Б., Зуев В.С. Биохимические свойства сальмонелл при обитании их в водной среде. *Ветеринарная патология*. 2007; (1): 81–5.

References

1. Chugunova E.O., Tatarnikova N.A., Prokhorova T.S. *Development of an Accelerated Method and Construction of a Nutrient Medium for the Isolation of Salmonella from Foods [Razrabotka uskorennoogo sposoba i konstruirovaniye pitatel'noy sredy dlya vydeleniya sal'monell iz pishchevykh produktov]*. Perm': Prokrost; 2017. (in Russian)
2. Ames B.N. The detection of chemical mutagens with enteric bacteria. In: Hollaender A., ed. *Chemical Mutagens*. Boston: Springer; 1971: 267–82. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8966-2_9
3. Zeiger E. The test that changed the world: The Ames test and the regulation of chemicals. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen*. 2019; 841: 43–8. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.05.007>
4. OECD Library. Test 471: 2020, IDT. Bacterial reverse mutation test. Available at: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-471-bacterial-reverse-mutation-test_9789264071247-en
5. Maron D.M., Ames B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res*. 1983; 113(3-4): 173–215. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(83\)90010-9](https://doi.org/10.1016/0165-1161(83)90010-9)

Original article

6. Vijay U., Gupta S., Mathur P., Suravajhala P., Bhatnagar P. Microbial mutagenicity assay: Ames test. *Bio. Protoc.* 2018; 8(6): e2763. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2763>
7. Zeiger E. Bacterial mutation assays. *Methods Mol. Biol.* 2013; 1044: 3–26. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-529-3_1
8. Escobar P.A., Kemper R.A., Tarca J., Nicolette J., Kenyon M., Glowienke S., et al. Bacterial mutagenicity screening in the pharmaceutical industry. *Mutat. Res.* 2013; 752(2): 99–118. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2012.12.002>
9. Mortelmans K. A perspective on the development of the Ames Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 2019; 841: 14–6. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.04.004>
10. Schoeny R., Cross K.P., DeMarini D.M., Elespuru R., Hakura A., Levy D.D., et al. Revisiting the bacterial mutagenicity assays: Report by a workgroup of the International Workshops on Genotoxicity Testing (IWGT). *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 2020; 849: 503137. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2020.503137>
11. Egorova O.V. To the procedure of confirmation of the laboratory's competence in performing mutagenicity assessment using the Ames test. *Toksikologicheskii vestnik.* 2021; 29(4): 4–13. <https://doi.org/10.36946/0869-7922-2021-29-4-4-13> <https://elibrary.ru/dpghdx> (in Russian)
12. Levy D.D., Hakura A., Elespuru R.K., Escobar P.A., Kato M., Lott J., et al. Demonstrating laboratory proficiency in bacterial mutagenicity assays for regulatory submission. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 2019; 848: 403075. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.07.005>
13. Hamel A., Roy M., Proudlock R. The bacterial reverse mutation test. Chapter 4. In: Proudlock R., ed. *Genetic Toxicology Testing. A Laboratory Manual.* Academic Press; 2016: 79–138.
14. Mortelmans K., Zeiger E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.* 2000; 455(1–2): 29–60. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(00\)00064-6](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(00)00064-6)
15. Andrushevich A.S., Tyapsha Yu.I., Dubanevich O.V., Strel'chenya I.I. Biochemical properties of museum strains *Salmonella Dublin*, *Salmonella cholerae suis*, *Salmonella typhimurium*. *Epizootologiya, immunobiologiya, farmakologiya i sanitariya.* 2020; (1): 39–44. <https://elibrary.ru/gxlrwd> (in Russian)
16. Busch D.B., Archer J., Amos E.A., Hatcher J.F., Bryan G.T. A protocol for the combined biochemical and serological identification of the Ames mutagen tester strains as *Salmonella typhimurium*. *Environ. Mutagen.* 1986; 8(5): 741–51. <https://doi.org/10.1002/em.2860080509>
17. Speck W.T., Ellner P.D., Rosenkranz H.S. Mutagenicity testing with *Salmonella typhimurium* strains. I. Unusual phenotypes of the tester strains. *Mutat. Res.* 1975; 28(1): 27–30. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(75\)90310-3](https://doi.org/10.1016/0027-5107(75)90310-3)
18. Pavlova I.B., Zuev V.S. Biochemical properties of *Salmonella* living in the aquatic environment. *Veterinarnaya patologiya.* 2007; (1): 81–5. (in Russian)
19. Tan C.S., Pasculescu A., Lim W.A., Pawson T., Bader G.D., Linding R. Positive selection of tyrosine loss in metazoan evolution. *Science.* 2009; 325(5948): 1686–8. <https://doi.org/10.1126/science.1174301>
20. Begüm Ç., Doğruöz G.N. The biotechnological potentials of bacteria isolated from Parsik cave, Turkey: Measuring the enzyme profiles, antibiotic resistance and antimicrobial activity in bacteria. *Johnson Matthey Technol. Rev.* 2020; 64(4): 396–406. <https://doi.org/10.1595/205651320X15923194903811>
21. Bausch C., Peekhaus N., Utz C., Blais T., Murray E., Lowary T., Conway T. Sequence analysis of the GntII (subsidiary) system for gluconate metabolism reveals a novel pathway for L-idoic acid catabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1998; 180(14): 3704–10. <https://doi.org/10.1128/JB.180.14.3704-3710.1998>
22. Irai A.S., Ezawa K.U., Wamura M.S., Tsushima T.M., Imura T.S. Effect of glucose on the mutagenic sensitivity of *Salmonella typhimurium* tester strains. *Mutat. Res. Environ. Mutagen. Relat. Subj.* 1978; 54(2): 253–4.
23. Porwollik S., Wong R.M., Sims S.H., Schaaper R.M., DeMarini D.M., McClelland M. The *ΔuvrB* mutations in the Ames strains of *Salmonella* span 15 to 119 genes. *Mutat. Res.* 2001; 483(1–2): 1–11. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(01\)00239-1](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(01)00239-1)
24. Matsumura S., Ito Y., Morita O., Honda H. Genome resequencing analysis of *Salmonella typhimurium* LT-2 strains TA98 and TA100 for the establishment of a next-generation sequencing-based mutagenicity assay. *J. Appl. Toxicol.* 2017; 37(9): 1125–8. <https://doi.org/10.1002/jat.3463>