

DOI: 10.36871/vet.san.hyг.ecol.202001010

УДК 579.67:579.85:615.9:593.174.1:576.08

Дата поступления: 12.11.2019

Дата опубликования: 26.03.2020

Для цитирования: Хабирова (Галлямова) С.Р., Идиятов И.И., Бирюля В.В.,
Шуралев Э.А., Мукминов М.Н.For citation: Khabirova (Gallyamova) S.R., Idiyatov I.I., Birulya V.V., Shuralev E.A.,
Mukminov M.N.

ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПРИРОДНЫХ БИОТОПОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ ПУТЕМ БИОТЕСТИРОВАНИЯ НА ПРОСТЕЙШИХ И КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК

¹Хабирова (Галлямова) С.Р., аспирант²Идиятов И.И., канд. биол. наук, старший научный сотрудник²Бирюля В.В., канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник^{1,2}Шуралев Э.А., канд. вет. наук, ведущий научный сотрудник, доцент¹Мукминов М.Н., д-р биол. наук, профессор¹Казанский (Приволжский) федеральный университет,
Казань 420008, Российская Федерация²Федеральный центр токсикологической, радиационной
и биологической безопасности,
Казань 420075, Российская Федерация
E-mail: galliamova95@mail.ru

Установлена безопасность штаммов молочнокислых бактерий *Lactobacillus plantarum* и *Lactococcus lactis*, выделенных из природных биотопов. В опыте на культуре клеток почки эмбриона человека линии Нек 293 показано, что испытуемые микроорганизмы не оказывают негативного воздействия на их морфологию и пролиферативную активность, не обладают цитотоксичностью в титрах $3,9 \dots 500 \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Значения исследуемых показателей при сокультивировании с бактериями не имели достоверных отличий от контроля. Абсолютное число клеток в опыте и контроле находилось в пределах $3,6 \dots 4,3 \cdot 10^5$ кл/мл, индекс пролиферации составил $0,68 \dots 0,79$, жизнеспособность – $83,50 \dots 89,90\%$. При экспонировании с инфузориями *Stylonychia mytilus* токсического действия штаммов не выявлено, процент их гибели в опытных и контрольных пробах не имел достоверных различий. Выживаемость простейших после экспозиции с клеточной суспензией *Lactobacillus plantarum* М3 в разведениях $5 \cdot 10^{11} \dots 3,9 \cdot 10^9$ КОЕ/мл составила $94,50 \dots 92,67\%$, *Lactobacillus plantarum* М14 – $94,3 \dots 93,50$, *Lactococcus lactis* С4 – $94,33 \dots 93,10$, *Lactococcus lactis* С5 – $94,30 \dots 93,20$, *Lactococcus lactis* Е8 – $94,67 \dots 93,00\%$.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, культура клеток, морфология, пролиферативная активность, простейшие, токсичность.

SAFETY ASSESSMENT OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM
NATURAL BIOTOPES USING PROTOZOA AND CELL CULTURE BIOASSAYS

¹Khabirova (Gallyamova) S.R., ²Idiyatov I.I., ²Birulya V.V.,

^{1,2}Shuralev E.A., ¹Mukminov M.N.

¹Kazan Federal University,
Kazan 420008, Russian Federation

²Federal Center of Toxicological, Radiation and Biological Safety,
Kazan 420075, Russian Federation

The safety of lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* and *Lactococcus lactis* isolated from natural biotopes has been established. In an experiment on a cell culture of a kidney of a human embryo of the Hek 293 line, it was shown that the tested microorganisms did not adversely affect their morphology and proliferative activity; in titers of $3,9...500 \times 10^8$ CFU/ml, they did not have cytotoxicity. The values of the studied parameters against the background of co-cultivation with bacteria did not have significant differences with the control. The absolute number of cells in the experiment and control was in the range of $3,6...4,3 \times 10^5$ cells/ml, the proliferation index was $0,68...0,79$, and the viability was $83,50...89,90\%$. When exposed to *Stylonychia mytilus* ciliates, no toxic effects of the strains were detected; the percentage of their deaths in the experimental and control samples did not differ significantly. The survival of protozoa after exposure with a cell suspension of *Lactobacillus plantarum* M3 in dilutions of $5 \times 10^{11}...3,9 \times 10^9$ CFU/ml was $94,50...92,67\%$, *Lactobacillus plantarum* M14 – $94,3...93,50\%$, *Lactococcus lactis* C4 – $94,33...93,10\%$, *Lactococcus lactis* C5 – $94,30...93,20\%$, *Lactococcus lactis* E8 – $94,67...93,00\%$.

Keywords: lactic acid bacteria, cell culture, morphology, proliferative activity, protozoa, toxicity.

Введение

Определять безопасность микроорганизмов, используемых в биотехнологической промышленности, необходимо, поскольку номенклатура штаммов постоянно расширяется [5]. Опыт применения штаммов молочнокислых бактерий в целом подтверждает их безопасность и отсутствие у них способности обуславливать инфекционные и инвазионные заболевания, однако эксперты ФАО-ВОЗ признают вероятность появления побочных эффектов при их применении [4].

Целью данного исследования было установить безопасность выделенных из природных биотопов штаммов молочнокислых бактерий в опыте на биологических моделях.

Материалы и методы

Работа выполнена на перевиваемой клеточной культуре почки эмбриона человека линии Hek 293 и простейших *Stylonychia mytilus*.

Культура клеток была предоставлена Научно-образовательным центром

фармацевтики Казанского (Приволжского) федерального университета. Клетки культивировали в питательной среде DMEM («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (Gibco, США), 0,5% цэфтриаксона («Синтез», Россия) и 0,5% L-глутамина 200 мМ (Gibco, США) в CO₂-инкубаторе MCO-19AIC (Sanyo, Япония) при 5% CO₂, температуре 37°C.

Штаммы молочнокислых бактерий *Lactobacillus plantarum* (условно обозначенные M3 и M14) и *Lactococcus lactis* (C4, C5 и E8), выделенные из природных биотопов, культивировали на среде MRS в течение 48 ч в условиях термостата при температуре 30°C. Выросшие культуры смывали с поверхности питательной среды изотоническим раствором хлорида натрия. Концентрацию микробных клеток в суспензиях оценивали методом высева на плотные питательные среды в чашках Петри с последующим подсчетом выросших колоний. Определение их безопасности проводили при совместном культивировании с клетками Hek 293.

Для этого суспензию клеток почки плотностью $2,5 \cdot 10^5$ кл/мл питательной среды разливали в лунки стерильного культурального планшета (Eppendorf AG, Германия) по 190 мкл в каждую. Исследуемые пробы клеточной суспензии микроорганизмов вносили в лунки в количестве 10 мкл в дозах, соответствующих 3,9; 7,8; 15,6; 31,3; 62,5; 125; 250 и $500 \cdot 10^8$ КОЕ/мл, в качестве контроля использовали такое же количество физиологического раствора. Число повторностей в группе составляло 12. Планшеты с клетками выдерживали в CO_2 -инкубаторе в течение 24 ч. По истечении указанного времени опыт оценивали. Культуральные и морфологические показатели клеток изучали согласно общепринятой методике [3]. Микрофотосъемку проводили на микроскопе NICON ECLIPS TS 100 с цифровой камерой DCM 500 и программным обеспечением Score Photo 3.0.

Затем клетки диспергировали смесью растворов версена (0,02%) («ПанЭко», Россия) и трипсина (0,025%) («ПанЭко», Россия) в соотношении 1:9 и выдерживали в термостате в течение 10...15 мин при температуре 37°C . Для прекращения действия трипсина и версена клетки осаждали центрифугированием в течение 2 мин при 1500 об/мин, надосадочную жидкость сливали, осадок перемешивали с 200 мкл питательной среды. Подсчет выросших клеток осуществляли в камере Горяева, для определения их жизнеспособности к клеточной суспензии добавляли 200 мкл 0,5%-го водного раствора трипанового синего (живые клетки оставались бесцветными, мертвые окрашивались в синий цвет). Воздействие изолятов на клетки определяли путем вычисления коэффициента жизнеспособности, индекса пролиферации и индекса цитотоксичности.

Токсичность штаммов в опыте на простейших определяли по жизнеспособности последних [6]. Готовили маточные растворы клеточной суспензии бактерий, культивированных в течение 48 ч, затем путем неоднократных разведений их дистиллированной водой получали рабочие растворы, соответствующие до-

зам: $5 \cdot 10^{11}$... $3,9 \cdot 10^9$ КОЕ/мл. В лунки планшета вносили по 20 мкл среды со стилонихиями, проводили их подсчет, затем добавляли 20 мкл исследуемой пробы. После чего, спустя 5 мин, проводили предварительный просмотр и подсчет живых инфузорий. Планшет с исследуемым материалом помещали в термостат и экспонировали в течение 3 ч при температуре 21°C . Затем подсчитывали живые инфузории, определяли процент их гибели. Опыты проводили в пяти повторностях.

Статистическую обработку полученного цифрового материала осуществляли методом вариационной статистики с применением программы Microsoft Excel.

Результаты исследований и обсуждение

Оценка морфологических параметров клеток – это важный критерий при исследовании воздействия на клеточные популяции различных веществ. Так, при культивировании клеток линии Нек 293 с клеточной суспензией каждого из изолятов в исследуемых концентрациях существенных изменений в морфологии клеток в сравнении с контролем не выявлено, в поле зрения плотность клеток была одинаковой, клетки образовывали полноценный монослой, имели характерные размеры и форму, четко очерченную мембраной цитоплазму, ядро с ядрышками, вакуолизацию плазмолеммы. Микрофотографии клеток почки эмбриона человека линии Нек 293Т при культивировании в присутствии клеточной суспензии (КС) изолятов представлены на рисунке 1.

Важным проявлением жизнеспособности клеток является их пролиферация, выражающаяся в увеличении числа клеток в культуре. Культивирование клеток почки с КС штаммов не оказывало негативного воздействия на их абсолютное число, значения в опытных группах не имели достоверных отличий от контроля и находились в пределах $3,6$... $4,3 \cdot 10^5$ кл/мл.

Чтобы оценить степень воздействия микроорганизмов на клетки почки, были

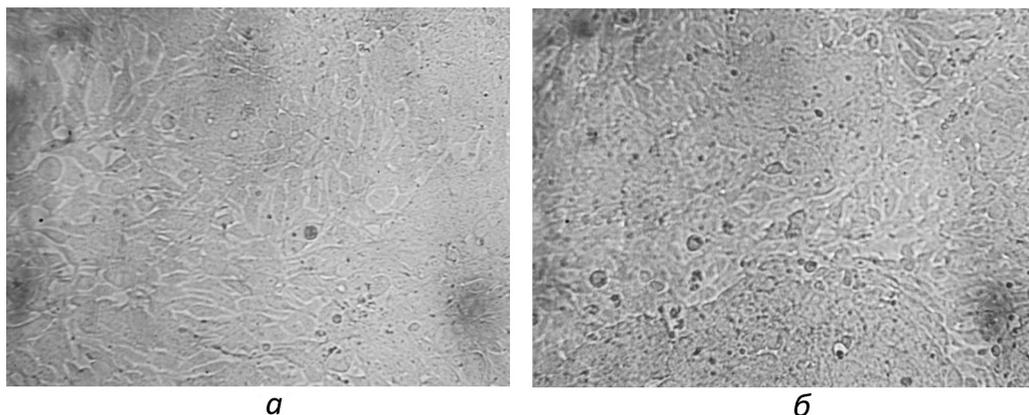


Рис. 1. Микрофотографии клеток почки эмбриона человека линии Нек 293 при культивировании в течение 24 ч в среде DMEM, содержащей клеточную суспензию изолятов: **а** – *Lactobacillus plantarum*, **б** – *Lactococcus lactis*; титр $5 \cdot 10^{10}$ КОЕ/мл, $\times 200$

рассчитаны коэффициент жизнеспособности, индексы пролиферации и цитотоксичности. Жизнеспособность клеток при совместном культивировании с клеточной суспензией штаммов в исследуемых титрах не имела достоверных отличий от контроля и находилась в пределах 83,50...89,90% (табл. 1).

Индекс пролиферации клеток почки линии Нек 293 на фоне сокультивирования с суспензией молочнокислых бактерий составил 0,68...0,79, при 0,74 в контроле, различия были недостоверными.

Индекс цитотоксичности клеточной суспензии штаммов в исследуемых титрах также не имел достоверных отличий от контроля (рис. 2).

Таким образом, при культивировании перевиваемой клеточной культуры почки эмбриона человека линии Нек 293 в присутствии клеточной суспензии молочнокислых бактерий *Lactobacillus plantarum* и *Lactococcus lactis* в титрах 3,9; 7,8; 15,6; 31,3; 62,5; 125; 250 и $500 \cdot 10^8$ КОЕ/мл в течение 24 ч изменений морфологических и культуральных параметров клеток не

Таблица 1

Жизнеспособность клеток почки эмбриона человека линии Нек 293 при культивировании в течение 24 ч с клеточной суспензией молочнокислых бактерий, %

Штамм	Титр микроорганизмов, 10^8 КОЕ/мл							
	500	250	125	62,5	31,3	15,6	7,8	3,9
<i>Lactobacillus plantarum</i> M3	85,17± 3,43	85,50± 3,65	86,00± 3,50	87,11± 2,89	87,33± 3,17	87,50± 2,65	87,33± 3,17	87,90± 3,00
<i>Lactobacillus plantarum</i> M14	85,00± 2,50	86,00± 2,50	86,00± 2,65	86,33± 2,67	87,00± 3,00	87,10± 2,60	87,33± 2,67	87,40± 2,60
<i>Lactococcus lactis</i> C4	85,33± 2,67	86,10± 3,00	86,17± 2,43	86,91± 2,89	87,50± 3,00	87,33± 3,17	87,70± 3,20	87,50± 3,00
<i>Lactococcus lactis</i> C5	85,20± 2,90	86,50± 2,65	85,91± 2,89	86,33± 3,17	87,00± 2,65	87,00± 3,00	87,11± 2,89	87,51± 2,37
<i>Lactococcus lactis</i> E8	86,10± 2,65	86,43± 3,17	86,67± 2,43	87,00± 2,65	87,00± 3,00	87,51± 2,89	87,33± 2,67	87,63± 2,97
Контроль	87,50±3,65							

Примечание: * – различия с контролем достоверны, $p \leq 0,05$

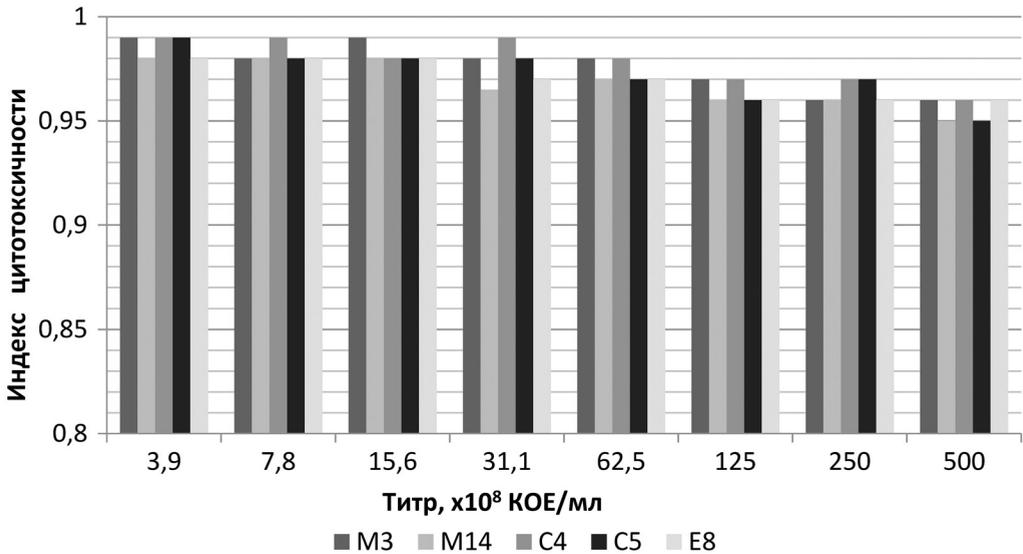


Рис. 2. Индекс цитотоксичности молочнокислых бактерий для клеток почки эмбриона человека линии HeK 293 при культивировании в течение 24 ч в среде DMEM

установлено. Сокультивирование с микроорганизмами не оказывало воздействия на пролиферативную активность клеточной линии, значения коэффициента жизнеспособности, индексов пролиферации и цитотоксичности не имели достоверных отличий от контроля. Следовательно, исследуемые штаммы в указанных титрах не обладают цитотоксичностью.

Результаты исследования токсичности молочнокислых бактерий в опыте на

простейших *Stylonychia mytilus* приведены в таблице 2.

Данные, приведенные в таблице 2, свидетельствуют о том, что клеточная суспензия бактерий в течение 3 ч экспонирования с инфузориями не оказывала на них токсического действия, процент гибели инфузорий в опытных и контрольных пробах достоверно не различался. Выживаемость инфузорий после экспозиции с клеточной суспензией *Lactobacillus plan-*

Таблица 2

Гибель простейших *Stylonychia mytilus* при экспозиции с клеточной суспензией молочнокислых бактерий, %

Штамм	Титр микроорганизмов, 10^9 КОЕ/мл							
	500	250	125	62,5	31,3	15,6	7,8	3,9
<i>Lactobacillus plantarum</i> M3	6,33± 2,17	6,11± 2,09	7,00± 2,50	7,33± 2,17	6,70± 2,34	6,11± 2,59	5,89± 2,11	5,50± 2,00
<i>Lactobacillus plantarum</i> M14	6,50± 3,00	6,20± 2,65	6,17± 2,43	6,00± 2,65	6,00± 2,00	5,89± 2,61	5,70± 2,65	6,00± 2,65
<i>Lactococcus lactis</i> C4	6,89± 1,91	6,90± 2,50	6,71± 2,59	6,50± 3,00	6,77± 2,43	6,10± 2,50	5,89± 2,51	5,67± 2,43
<i>Lactococcus lactis</i> C5	6,80± 2,50	6,50± 2,00	6,17± 2,43	6,10± 2,65	6,00± 2,50	5,81± 2,69	5,70± 2,51	5,80± 2,65
<i>Lactococcus lactis</i> E8	6,50± 2,65	6,00± 2,51	7,00± 2,65	6,83± 2,57	6,67± 2,43	6,11± 1,59	5,89± 2,61	5,33± 2,17
Контроль	5,11±2,59							

Примечание: * – различия с контролем достоверны, $p \leq 0,05$.

тарум М3 в исследуемых разведениях составила 94,50...92,67%, *Lactobacillus plantarum* М14 – 94,3...93,50, *Lactococcus lactis* С4 – 94,33...93,10, *Lactococcus lactis* С5 – 94,30...93,20, *Lactococcus lactis* Е8 – 94,67...93,00%.

Таким образом, исследуемые штаммы не обладают токсичностью в отношении одноклеточных организмов на примере простейших *Stylonychia mytilus*.

Заключение

Результаты, полученные в опыте на клеточной культуре линии Нек 293 и простейших *Stylonychia mytilus*, свидетельствуют о том, что выделенные из природных биотопов штаммы молочнокислых бактерий *Lactobacillus plantarum* М3 и М14 и *Lactococcus lactis* С4, С5 и Е8 являются безопасными и могут быть использованы в дальнейших исследованиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Валиуллин Л.Р., Егоров В.И., Шангараев Н.Г. и др. Цитогенетические изменения клеток линии эпителия легкого эмбриона крупного рогатого скота при воздействии дельтаметрина // Ветеринарный врач. – 2017. – №1. – С. 32-37.
2. ГОСТ 31674-2012. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения общей токсичности.
3. Животная клетка в культуре (Методы и применение в биотехнологии): монография / под ред. Л.П. Дьяконова – М.: Спутник+, 2009.
4. Идиятов И.И., Валиуллин Л.Р., Бирюля В.В. и др. Цитотоксическая активность Т-2 токсина к перевиваемым культурам клеток эпителия легкого эмбриона крупного рогатого скота // Гены и клетки. – 2017. – Т. XII. – №1. – С. 41-46.
5. Методические указания по санитарно-эпидемиологической оценке безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов: МУ 2.3.2.2789-10. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011.
6. Шеина Н.И. Критерии оценки биобезопасности микроорганизмов, используемых в биотехнологической промышленности // Вестник ОГУ. – 2012. – №6 (142). – С. 165-169.

REFERENCES

1. Valiullin L.R., Egorov V.I., Shangaraev N.G. i dr. Czitogeneticheskie izmeneniya kletok linii e`piteliya legkogo e`mbriona krupnogo rogatogo skota pri vozdejstvii del`tametrina // Veterinarny`j vrach. – 2017. – №1. – S. 32-37.
2. GOST 31674-2012. Korma, kombikorma, kombikormovoe sy`r`e. Metody` opredeleniya obshhej toksichnosti.
3. Zhivotnaya kletka v kul`ture (Metody` i primeneniye v biotekxnologii): monografiya / pod red. L.P. D`yakonova – M.: Sputnik+, 2009.
4. Idiyatov I.I., Valiullin L.R., Biryulya V.V. i dr. CZitotoksicheskaya aktivnost` T-2 toksina k perevivaemy`m kul`turam kletok e`piteliya legkogo e`mbriona krupnogo rogatogo skota // Geny` i kletki. – 2017. – T. XII. – №1. – S. 41-46.
5. Metodicheskie ukazaniya po sanitarno-e`pidemiologicheskoy oczenke bezopasnosti i funkczional`nogo potencziala probioticheskikx mikroorganizmov, ispol`zuemy`kx dlya proizvodstva pishhevuy`kx produktov: MU 2.3.2.2789-10. – M.: Federal`ny`j cenztr gigeny` i e`pidemiologii Rospotrebnadzora, 2011.
6. Sheina N.I. Kriterii oczenki biobezopasnosti mikroorganizmov, ispol`zuemy`kx v biotekhnologicheskoy promy`shlennosti // Vestnik OGU. – 2012. – №6 (142). – S. 165-169.