

---

## ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ *BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM* 1, *ESCHERICHIA COLI* M-17 В БИФИКОЛЕ ПРИ СОВМЕСТНОМ ИХ ВЫРАЩИВАНИИ

А.В. Ладыгина

Лаборатория бактериальных вакцин и препаратов из нормофлоры  
Государственный научно-исследовательский институт стандартизации  
и контроля медицинских биологических препаратов имени Л.А. Тарасевича  
Пер. Сивцев Вражек, 41, Москва, Россия, 119002  
8(903)2448567

На модели биосовместимости выявлен сложный механизм взаимодействия культур *B. bifidum* 1 и *E. coli* M-17 в смешанной популяции при совместном их культивировании: бифидобактерии и продукты их метаболизма ингибируют рост кишечной палочки, а кишечная палочка и продукты ее метаболизма стимулируют рост бифидобактерий.

**Ключевые слова:** бификол, взаимодействие культур *B. bifidum* 1 и *E. coli* M-17, метаболиты, ингибирующее и стимулирующее влияние.

Постоянное влияние неблагоприятных факторов на жизнедеятельность человека, нередко превышающее компенсаторные возможности состояния системы «окружающая среда — макроорганизм — микробиоциноз», способствует развитию дисбиотического состояния и, как следствие этого, проявлению заболеваний инфекционной и неинфекционной природы. Для профилактики и лечения таких состояний в медицинской практике широко используют пробиотики [1]. Представители нормофлоры принимают самое непосредственное участие в биохимических, метаболических и иммунологических процессах макроорганизма за счет продукции ими различных ферментов, витаминов, биологически активных (антибиотикоподобных) веществ и других, разных по действию, продуктов метаболизма

Лечебное действие монопрепарата ограничено индивидуальным спектром биологической активности штамма, на основе которого изготовлен пробиотик. Для повышения и расширения лечебного действия пробиотиков в практику здравоохранения внедрены комплексные препараты, изготовленные на основе двух и более штаммов одного вида или разных видов представителей нормофлоры: бификол, ацилакт, аципол, флорин форте.

Отечественный комплексный препарат бификол разработан на основе двух видов микроорганизмов: *Bifidobacterium bifidum* 1 и *Escherichia coli* M-17 [1]. Несмотря на длительный срок производства препарата, серии бификола отличаются друг от друга по показателям количественного содержания живых бифидобактерий и кишечной палочки в дозе. Это может быть обусловлено несовершенством технологии изготовления бификола, использованием различных по составу питательных сред, изменением свойств микроорганизмов при совместном их культивировании, несовместимостью используемых штаммов и другими факторами. Механизм взаимодействия культур в смешанной популяции бификола недостаточно изучен. В этой связи, целью настоящего исследования явилось изучение взаимовлияния культур *B. bifidum* 1 и *E. coli* M-17 и продуктов их жизнедеятельности друг на друга при совместном их культивировании.

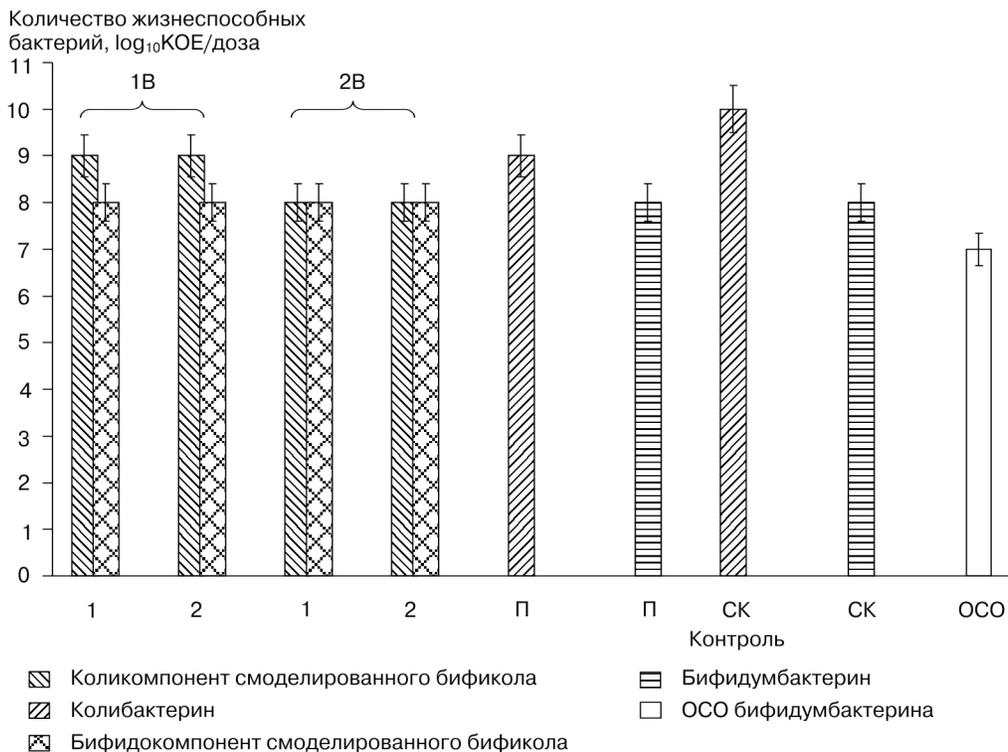
**Материалы и методы исследования.** Для исследования использовали коммерческие серии бифидумбактерина и колибактерина.

Питательные среды: Блаурокка, Блаурокка с натрия азидом, казеиново-дрожжевую — КД-5а, МПБ, приготовленные в соответствии с утвержденными нормативными документами.

Взаимодействие бифидобактерий и кишечной палочки в бификоле изучали в смоделированных опытах: 1) при одномоментном посеве в среды Блаурокка или КД-5а по 1 дозе бифидумбактерина и колибактерина (смоделированный бификол (СБ) — первый вариант (1В)) или культуры 1-го пассажа бифидобактерий и кишечной палочки заседали одновременно по 1 мл в пробирки с 18 мл среды Блаурокка и КД-5а — (СБ-2В); 2) при посеве 1 дозы колибактерина в центрифугат и фильтрат культуральной жидкости, полученной от суточной, двух- и трехсуточной культуры *B. bifidum* 1; 3) при посеве 1 дозы бифидумбактерина в центрифугат и фильтрат культуральной жидкости суточной культуры *E. coli* M-17. Количество выросших колоний в каждом опыте подтверждали путем высева десятикратных разведений выросшей культуры на питательные среды Блаурокка, Блаурокка с азидом натрия, МПБ. Центрифугаты и фильтраты культуральной жидкости (КЖ) бифидобактерий и кишечной палочки получали путем центрифугирования бактериальной взвеси при 3500 об/мин. в течение 10 мин. с последующей фильтрацией через фильтр миллипор (размер пор 0,2 мкм). В исследованиях использовали центрифугаты и фильтраты суточной, двух- и трехсуточной культуральной жидкости бифидобактерий (ЦБ1, ЦБ2, ЦБ3) и суточной культуральной жидкости кишечной палочки (ЦК).

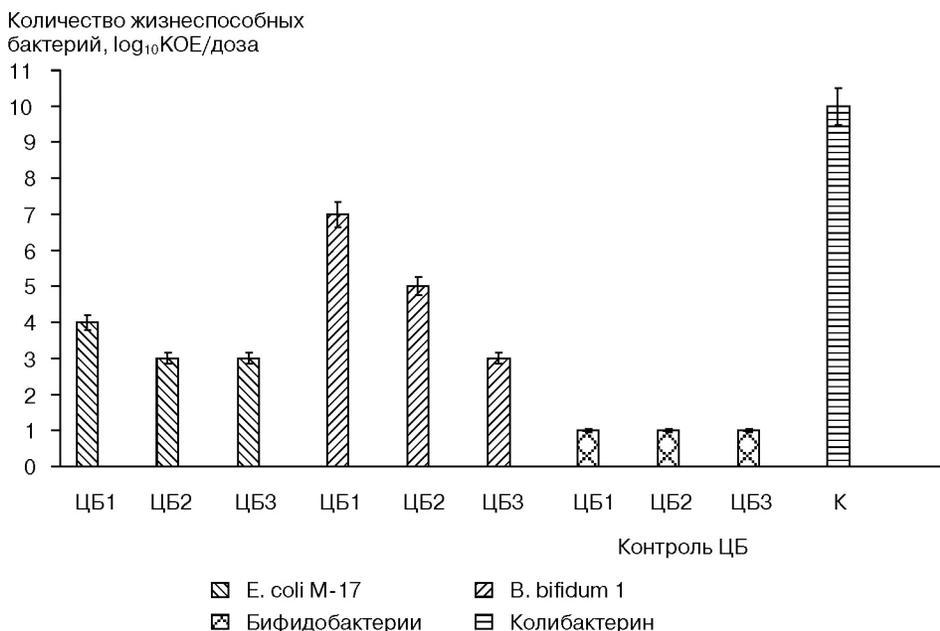
**Результаты исследования и их обсуждение.** Технология изготовления бификола предусматривает совместное культивирование *B. bifidum* 1 и *E. coli* M-17 на последнем этапе получения производственной биомассы. В специальных опытах по изучению биосовместимости штаммов использованы два варианта смоделированного бификола (СБ-1В и СБ-2В). Установлено, что при совместном культивировании обе культуры в смешанной популяции вели себя по-разному. Так, культура 1-го пассажа бифидобактерий в смоделированном бификоле 2В ингибировала рост кишечной палочки: через 24 ч совместного культивирования содержание коликомпонента в бификоле 2В было на два порядка меньше по сравнению с суточной культурой (СК) (рис. 1-2В). В то же время кишечная палочка стимулировала рост бифидобактерий: через 24 ч (вместо 48—72 ч) содержание бифидобактерий достигало  $10^8$  живых микробных клеток в 1 мл (микрок. кл/мл) (рис. 1-1В, 2В). Особенно четко эта закономерность наблюдалась при оценке взаимовлияния их продуктов метаболизма на рост при использовании центрифугатов и фильтратов культуральных жидкостей.

При посеве в центрифугаты ЦБ1, ЦБ2, ЦБ3 по 1 мл колибактерина с содержанием  $10^9$  микрок. кл/мл обнаружен рост кишечной палочки в количестве  $10^4$ — $10^3$  микрок. кл/мл. На фоне слабого роста кишечной палочки содержание бифидобактерий существенно увеличилось (до  $10^7$ ,  $10^5$ ,  $10^3$  микрок. кл/мл соответственно вместо исходного —  $10^1$  микрок. кл/мл в ЦБ). Посев в МПБ колибактерина подтвердил содержание живых бактерий кишечной палочки в количестве  $10^9$  микрок. кл/мл (контроль) (рис. 2).



**Рис. 1.** Содержание живых бифидобактерий и кишечной палочки через 24 ч при совместном культивировании двух штаммов:

1 — КД-5; 2 — Блаурокка; 1В — одномоментный посев по 1 дозе коли- и бифидумбактерина;  
 2В — одномоментный посев 24-часовых культур коли- и бифидобактерий;  
 П — монопрепарат, СК — 24-часовая культура

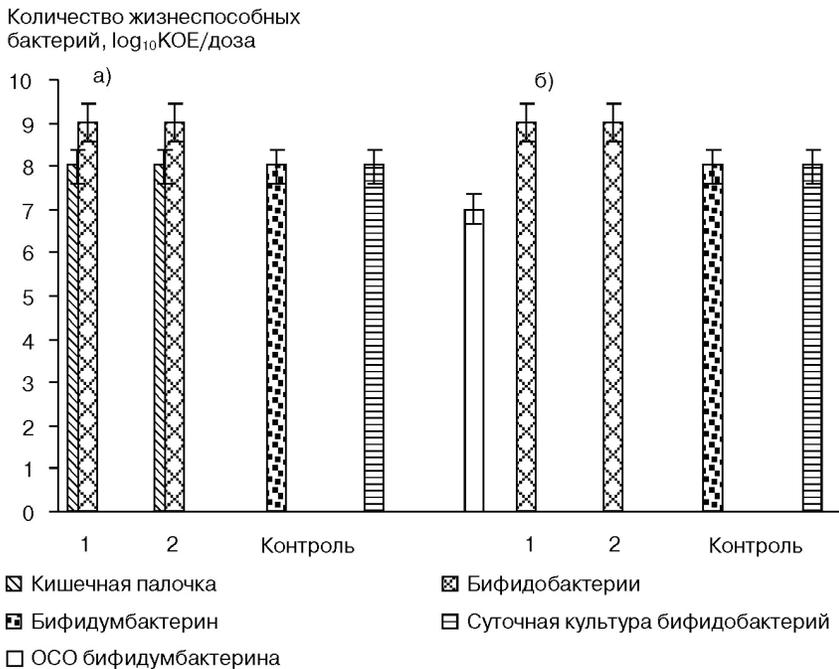


**Рис. 2.** Содержание выросших бактерий *E. coli* M-17 и *B. bifidum* 1 в мл при посеве в центрифугаты культуральной среды бифидобактерий через 24 ч культивирования

При коррекции рН с 4,5 до 7,0 содержание кишечной палочки возрастало в ЦБ2 до  $10^6$  микр. кл/мл (на два порядка выше) по сравнению с ее содержанием при росте в ЦБ2 с кислой реакцией, но было на три порядка ниже, чем в контроле ( $10^9$  микр. кл/мл).

Аналогичные результаты были получены при использовании фильтратов культуральной жидкости бифидобактерий. При отсутствии в фильтратах бифидобактерий содержание кишечной палочки увеличилось на два порядка (до  $10^6$  микр. кл/мл), однако было значительно ниже их содержания в контроле ( $10^{10}$  микр. кл/мл).

Противоположные результаты были получены при изучении влияния метаболитов кишечной палочки на рост бифидобактерий. В центрифугат и фильтрат суточной культуральной жидкости кишечной палочки засевали по 1 мл бифидумбактерина (рис. 3-а, 1) или суточной культуры бифидобактерий 1-го пассажа (рис. 3-а, 2) и выращивали в течение 24 ч.



**Рис. 3.** Содержание живых бифидобактерий и кишечной палочки в 1 мл при посеве в центрифугаты и фильтраты суточной культуральной жидкости кишечной палочки: а) центрифугат кишечной палочки; б) фильтрат кишечной палочки; 1 — посев 1 мл препарата бифидумбактерина; 2 — посев 1 мл суточной культуры бифидобактерий

Культура в центрифугатах и продукты метаболизма кишечной палочки оказывали стимулирующее действие на рост бифидобактерий: через 24 ч количество их достигало  $10^9$  микр. кл/мл вместо  $10^8$  микр. кл/мл; в контроле рост бифидобактерий учитывали через 72 ч (рис. 3-а). Эта же закономерность отмечена при использовании фильтрата КЖ кишечной палочки (рис. 3-б).

Из данных литературы известно, что метаболиты *E. coli* M17 могут стимулировать рост различных штаммов эшерихий, бифидобактерий и лактобацилл [2]. Наибольший эффект они оказывали на штамм продуцент. Аномально высокие ин-

дексы стимуляции были получены и для бифидобактерий. Хроматографический анализ состава препаратов показал, что из всех содержащихся в культуральной жидкости компонентов максимальной способностью стимулировать рост штамма-продуцента (*E. coli* M17) обладает янтарная кислота, являющаяся типичным продуктом брожения *E. coli*. Менее активным стимулятором оказалась глутаминовая кислота. В дальнейшем было исследовано более 20 компонентов культуральной жидкости и показано, что по характеру индивидуального действия на рост штамма-продуцента эти соединения можно условно разделить на 3 группы: 1) автостимуляторы роста (сукцинат, глутамат, ацетат, метионин, лизин); 2) автоингибиторы (аланин, аспарат, гистидин, формиат, цистеин); 3) нейтральные соединения. Совокупное действие указанных выше стимуляторов было значительно выше, чем каждого из них, при этом активность композиции возрастала, если в ее состав включали «нейтральные» соединения [2].

Проведенные нами исследования выявили сложный механизм взаимодействия бифидобактерий и кишечной палочки при их совместном выращивании. Накопление биомассы *E. coli* M17 и *B. bifidum* 1 при совместном культивировании зависит от посевной дозы, физиологического состояния культур в посевном материале и образования различного типа метаболитов, что может отразиться на соотношении живых бактерий *E. coli* M17 и *B. bifidum* 1 и создавать условия получения нестандартного препарата. Стимуляция роста бифидобактерий метаболитами *E. coli* M17 в данном случае связана, по-видимому, с автостимуляторами роста: сукцинатом, глутаматом, ацетатом, метионином и лизином.

#### ЛИТЕРАТУРА

- [1] Бондаренко В.М., Чупринина Р.П., Аладышева Ж.И. и др. Пробиотики и механизмы их лечебного действия // Эксперим. и клин. гастроэнтерол. — 2004. — 3. — С. 83—87.
- [2] Вахитов Т.Я., Петров Л.Н., Бондаренко В.М. Концепция пробиотического препарата, содержащего оригинальные микробные метаболиты // Журн. микробиол. — 2005. — 5. — С. 108—114.

### INVESTIGATION OF THE INTERACTION OF *BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM* 1 AND *ESCHERICHIA COLI* M-17 IN THE BIFICOL PRAPARATION DURING THEIR SIMULTANEOUS CULTIVATION

A.V. Ladygina

L.A. Tarassevich Institute  
Sivtsev Vraghek, 41, Moscow, Russia, 119002

Using the model of biocompatibility the complicated mechanism of interaction between the *B. bifidum* 1 and *E. coli* M-17 was revealed during the simultaneous cultivation of these strains. Bifidobacteria and the products of their metabolism were shown to inhibit the growth of *E. coli*, at the same time the products of metabolism of *E. coli* stimulate the growth of Bifidobacteria.

**Key words:** Bificol, cooperation *B. bifidum* and *E. coli* M-17 cultures, metabolites, inhibiting and stimulating effects.