

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ СОВМЕСТНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *B.BIFIDUM* И *E.COLI* НА АДАПТИРОВАННЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

Шарифуллина Д.Т., Низамов Р.Н., Низамов Р.Н., Юнусов И.Р., Рахматуллина Г.И.

Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности, г. Казань, Российская Федерация

Аннотация. Введенные в организм животных микробные вещества повышают радиоустойчивость, уменьшают процент смертности. Наибольшую значимость можно получить при использовании вакцинных препаратов на основе бактерий кишечного тифозной группы, которые в процессе жизнедеятельности продуцируют антибактериальные вещества, ферменты, антигены, энтеро- и экзотоксины, цитокины, обладающие радиозащитными свойствами. Проведенные испытания выявили сложный механизм взаимодействия бифидобактерий и эшерихий при их совместном выращивании. Накопление биомассы *E.coli* штамм «ПЛ-6» и *B.bifidum* 1 при совместном культивировании зависело от соотношения живых бактерий *E.coli* штамм «ПЛ-6» и *B.bifidum* 1. Микрокопирование мазков, изготовленных на 1-4-е сутки из монокультур, показало, что выросшие микробы по морфологии соответствовали указанным культурам. Концентрация микроорганизмов, определенная методом десятикратного разведения вышеуказанным методом, составляла 1×10^9 КОЕ/мл - *E.coli* и 1×10^7 КОЕ/мл - *B.bifidum*, при посевной дозе каждого вида микробов 1×10^8 КОЕ/мл.

Микрокопирование мазков, изготовленных из смеси культур, показало, что разведение 0,9:1,1-1,0:1,0 является наиболее оптимальным для совместного выращивания бифидума и кишечной палочки, так как при сравнительно равном количестве монокультур на 1-е сутки эшерихии усиленно размножаются, расщепляя компоненты среды Блаурокка и ингибируя рост бифидума, но с 3-х суток *B.bifidum* начинает превалировать, расщепляя *E.coli* и усваивая вещества, расщепленные кишечной палочкой.

Ключевые слова: *B.bifidum*, *e.coli*, облучение, микроорганизмы, радиорезистентность, Biotechnology

STUDYING THE POSSIBILITY OF JOINT CULTIVATION OF *B.BIFIDUM* AND *E.COLI* ON ADAPTED NUTRIENT MEDIA

Sharifullina D.T., Nizamov R.N., Nizamov R.N., Yunusov I.R., Rakhmatullina G.I.

Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Russian Federation

Annotation. Microbial substances introduced into the body of animals increase radio stability and reduce the mortality rate. The greatest significance can be obtained by using vaccines based on bacteria of the intestinal-typhoid group, which in the process of life produce antibacterial substances, enzymes, antigens, entero- and exotoxins, and cytokines with radioprotective properties. The tests revealed a complex mechanism of interaction between bifidobacteria and Escherichia in their joint cultivation. The biomass accumulation of *E.coli* strain «PL-6» and *B.bifidum* 1 during co-cultivation depended on the ratio of live bacteria *E.coli* strain «PL-6» and *B.bifidum* 1. Microcopy of smears made on days 1-4 from monocultures showed that the grown microbes in morphology corresponded to these cultures. The concentration of microorganisms, determined by tenfold dilution by the above method, was 1×10^9 CFU/ml - *E.coli* and 1×10^7 CFU/ml *B.bifidum*, with a sowing dose of each type of microbe 1×10^8 CFU/ml. Microcopy of smears made from a mixture of cultures showed that a dilution of 0,9:1,1-1,0:1,0 is most optimal for co-growing bifidum and Escherichia coli, since with a relatively equal number of monocultures on the 1st day Escherichiae multiply intensely, splitting the components of the Blaurock medium and inhibiting the growth of bifidum, but from the 3rd day *B.bifidum* begins to prevail, splitting *E.coli* and assimilating substances cleaved by *E.coli*.

Keywords: *B.bifidum*, *e.coli*, irradiation, micro-organisms, radio resistance.

Введение. Введенные в организм животных микробные вещества повышают радиоустойчивость [1, 2], уменьшают процент смертности [3, 4], активируют функцию клеток системы фагоцитирующих мононуклеаров в крови и тканях [5, 6], повышают устойчивость к экзогенным инфекциям, усиливают синтез антител, стимулируют процессы регенерации кроветворной ткани в облученном организме, способствуя нарастанию числа гранулоцитов и тромбоцитов, увеличивают

гемоглобин и эритроциты в период восстановления, усиливают процессы пролиферации и миграции стволовых клеток костного мозга, ускоряют дифференцировку клеточных элементов, увеличивают число эндо- и экзогенных очагов кроветворения в селезенке и костном мозге животных [7, 8]. Наибольшую значимость можно получить при использовании вакцинных препаратов на основе бактерий кишечного тифозной группы [9], которые в процессе жизнедеятельности продуцируют антибактериальные вещества, ферменты, антигены, энтеро- и экзотоксины, цитокины, обладающие радиозащитными свойствами [10].

Постановка задачи:

- определить оптимальное соотношение консорциума, изготовленного из смеси культур бифидобактерий и кишечной палочки для совместного выращивания;
- выявить сложный механизм взаимодействия бифидобактерий и эшерихий;
- получить комплексный пробиотик для дальнейшего изучения радиозащитной активности при острой лучевой болезни.

Материалы и методы. В качестве модельных микроорганизмов использовали коммерческий препарат - лиофилизированную монокультуру «Бифидумбактерин» (бифидобактерии) и *E.coli* «ПЛ-6» - штамм колибактерий, выращенный в лаборатории ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ». Микробы культивировали в жидких - мясопептонный бульон (МПБ), Эндо и Блаурокка и твердых - мясопептонный агар (МПА) питательных средах при $37\pm 1^\circ\text{C}$ (*E.coli* - на МПБ, МПА и Эндо, *B.bifidum* - на Блаурокка).

В несколько пробирок со средами МПБ и Блаурокка (по 18 мл) добавляли по 1 мл регидратированных монокультур *E.coli* штамм «ПЛ-6» и *B.bifidum* в количестве 10^7 - 10^8 КОЕ/мл, каждую в отдельности. Пробирки с культурой *E.coli* закрывали ватно-марлевыми пробками, *B.bifidum* - резиновыми для создания анаэробных условий, помещали в термостат при $37\pm 1^\circ\text{C}$ на 4 суток - бифидобактерии и 1 сутки - эшерихии.

После указанного времени каждую монокультуру осаждали при 3500 об/мин в течение 10 минут, супернатант отделяли, осадочную жидкость в количестве 1 см³ использовали для изготовления консорциума.

По одной пробе центрифугата каждой культуры было использовано для определения концентрации бактерий методом десятикратного разведения (до 10) с посевом на среду Эндо - *E.coli* и Блаурокка - *B.bifidum*, и изготовлением микробных композиций. Визуальный подсчет КОЕ каждой культуры в препаратах, окрашенных по Граму, показал, что в МПБ содержание *E.coli* составляло 10^9 КОЕ/мл и *B.bifidum* - 10^8 КОЕ/мл.

Для определения оптимальных пропорций исходных культур в консорциуме, было использовано 19 вариантов смешивания монокультур, из которых брали соответствующие взвеси микробов в вышеуказанной концентрации и тестируемых пропорциях (*E.coli*:*B.bifidum*): 0,1:1,9; 0,2:1,8; 0,3:1,7; 0,4:1,6; 0,5:1,5; 0,6:1,4; 0,7:1,3; 0,8:1,2; 0,9:1,1; 1,0:1,0; 1,1:0,9; 1,2:0,8; 1,3:0,7; 1,4:0,6; 1,5:0,5; 1,6:0,4; 1,7:0,3; 1,8:0,2; 1,9:0,1.

В пробирки с 8 мл питательной среды Блаурокка добавляли по 2 мл взвеси монокультур в указанных пропорциях и помещали в термостат при $37\pm 1^\circ\text{C}$ на 1-4 суток. Рост консорциума бактерий в питательной среде учитывали визуально и на препаратах.

В качестве контроля использовали по 1 мл центрифугатов монокультур, высеванных в среды МПБ и Блаурокка.

Результаты исследований. Визуальный контроль показал, что через 1 сутки культивирования в питательной среде в контрольной пробе (*E.coli*) и пробах с пропорциями монокультур 0,9:1,1-1,0:1,0 появлялось характерное для роста кишечной палочки помутнение. В пробах с меньшим содержанием *E.coli* (0,7:1,3-0,8:1,2) помутнение среды Блаурокка было незначительным. В пробах с разведением 0,1:1,9-0,6:1,4 изменения не были зарегистрированы. Через сутки помутнение в указанных пробах было более выражено, но через 3-е суток с начала культивирования было зарегистрировано нивелирование мутности в смеси культур, достигавшее максимума на 4-е сутки исследований. В контрольной пробе (*E.coli*) мутность среды достигла максимального значения с появлением колоний микроорганизмов. Через 3-4 суток в смеси культур были также зарегистрированы колонии микроорганизмов. В контрольной пробе рост колоний *B.bifidum* был зарегистрирован на 3-и сутки и достигал максимального значения на 4-е.

Микрокопирование мазков, изготовленных на 1-4-е сутки из монокультур, показало, что выросшие микробы по морфологии соответствовали указанным культурам. Концентрация микроорганизмов, определенная методом десятикратного разведения, составляла 1×10^9 КОЕ/мл - *E.coli* и 1×10^7 КОЕ/мл - *B.bifidum*, при посевной дозе каждого вида микробов 1×10^8 КОЕ/мл.

Микрокопирование мазков, изготовленных из смеси культур, показало, что разведение 0,9:1,1-1,0:1,0 является оптимальным для совместного выращивания бифидобактерий и кишечной палочки, так как при сравнительно равном количестве монокультур на 1-е сутки эшерихии усиленно размножаются,

расщепляя компоненты среды Блаурокка и ингибируя рост бифидума, но с 3-х суток *B.bifidum* начинает превалировать, расщепляя *E.coli* и усваивая вещества, расщепленные кишечной палочкой.

На рисунке 1 представлен препарат, изготовленный через 1 сутки после формирования консорциума микроорганизмов *E.coli* и *B.bifidum*.

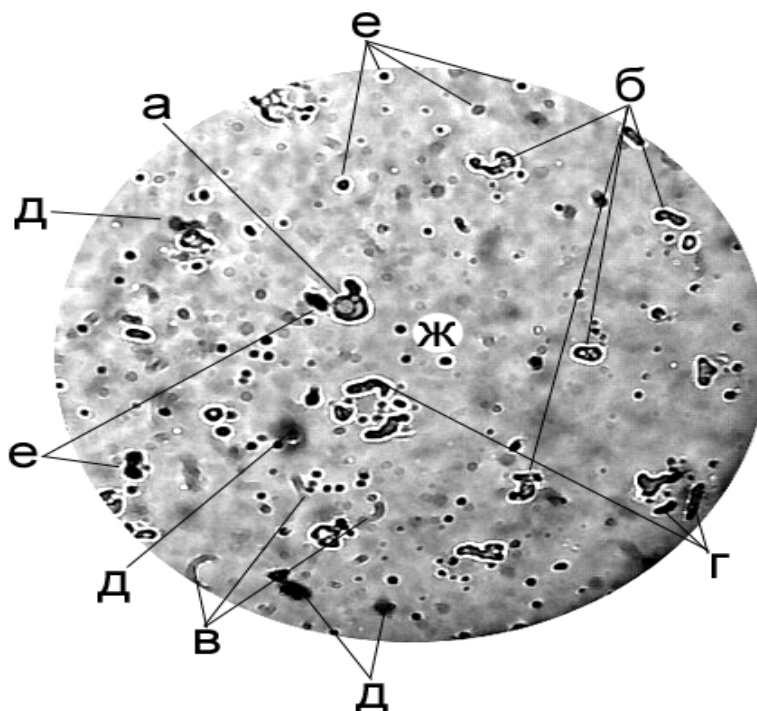


Рисунок 1 - Консорциум микроорганизмов *E.coli* и *B.bifidum* в среде Блаурокка (1-е сутки)

а - фрагменты клеточной стенки *E.coli*, элементы аутолиза цитоплазмы и гранулы, образовавшиеся в результате разрушения *B.bifidum*; б - частично аутолизированные клетки *E.coli* с характерными сферическими пустотами в цитоплазме; в - физиологически активная клетка *E.coli*; г - физиологически неактивная клетка *E.coli*; д - темные гранулы пигмента, образующегося в результате разрушения *B.bifidum*; е - бифидобактерии; ж - пространство между клетками заполнено гранулами пигмента, образовавшегося в результате разрушения *B.bifidum*

Выводы. Проведенные испытания выявили сложный механизм взаимодействия бифидобактерий и эшерихий при их совместном выращивании. Накопление биомассы *E.coli* штамм «ПЛ-6» и *B.bifidum* 1 при совместном культивировании зависело от состава монокультур, дозы для посева, физиологического состояния культур в посевном материале (содержание живых клеток, срок выращивания), образования различного типа метаболитов (бифидогенных и колициногенных факторов в культуральной жидкости), что и отражается на соотношении живых бактерий *E.coli* штамм «ПЛ-6» и *B.bifidum* 1

Микрокопирование мазков, изготовленных на 1-4-е сутки из монокультур, показало, что выросшие микробы по морфологии соответствовали указанным культурам. Концентрация микроорганизмов, определенная методом десятикратного разведения вышеуказанным методом, составляла 1×10^9 КОЕ/мл - *E.coli* и 1×10^7 КОЕ/мл - *B.bifidum*, при посевной дозе каждого вида микробов 1×10^8 КОЕ/мл.

Микрокопирование мазков, изготовленных из смеси культур, показало, что разведение 0,9:1,1-1,0:1,0 является наиболее оптимальным для совместного выращивания бифидума и кишечной палочки, так как при сравнительно равном количестве монокультур на 1-е сутки эшерихии усиленно размножаются, расщепляя компоненты среды Блаурокка и ингибируя рост бифидума, но с 3-х суток *B.bifidum* начинает превалировать, расщепляя *E.coli* и усваивая вещества, расщепленные кишечной палочкой.

Список использованных источников

1. Низамов Р.Н. Детоксикационная и гомеопротекторная активность сывороточно-бифидогенной композиции (СБК) на фоне комбинированного радиационно-термического поражения организма / Р.Н. Низамов, Т.Р. Гайнутдинов, Г.В. Конюхов, К.Н. Вагин, Н.М. Василевский, И.Р. Юнусов // В сборнике: Аграрная наука - сельскому хозяйству / Сборник материалов XIV Международной научно-практической конференции. В 2-х книгах, 2019. - С. 327-329.
2. Низамов, Р.Н. Способ лечения комбинированного поражения организма возбудителем сибирской язвы и ионизирующей радиацией / Н.С. Садыков, А.И. Никитин, Г.В. Конюхов, Э.Н.

Мустафина, Р.В. Нефедова, Т.Р. Мустафин, Д.Т. Шарифуллина, И.Р. Юнусов, Г.И. Рахматуллина, К.Т. Ишмухаметов // Патент на изобретение RU 2683650, 01.04.2019. Заявка № 2018104918 от 08.02.2018.

3. Шарифуллина, Д.Т. Использование веществ микробного происхождения для повышения радиорезистентности животных / Д.Т. Шарифуллина, Р.Н. Низамов, Г.В. Конюхов, Р.В. Нефедова, К.Н. Вагин, Г.И. Рахматуллина // Международная научно-практическая конференция «Современные системы биобезопасности и биозащиты в ветеринарной медицине» 20-24 сентября 2019 г. г. Феодосия (г. Харьков), АР Крым. - С. 314-315.

4. Бухарин, О.В. Взаимодействие *Bifidobacterium bifidum* с представителями нормальной микрофлоры в микросимбиозе кишечника человека / О.В. Бухарин, Н.Б. Перунова, Е.В. Иванова // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН, 2012. - № 3. - С. 4.

5. Гребенюк, А.Н. Основы радиобиологии и радиационной медицины / А.Н. Гребенюк, О.Ю. Стрелова, В.И. Легеза, Е.Н. Степанова // Учебное пособие, С.-П., 2012. - 225 с.

6. Бударков, В.А. Радиобиологический справочник / В.А. Бударков, В.А. Киршин, А.Е. Антоненко. - Минск: Ураджай, 1992. - С. 125-137.

7. Киршин, В.А. Состояние иммунокомпетентных клеток периферической крови и лимфы крупного рогатого скота при радиационных воздействиях / В.А. Киршин, В.А. Сафронова, Р.С. Тюменев, А.С. Титов // Иммунный статус человека и радиация / Сб. тезисов всес. научной конференции. - М., 1991. - 109 с.

8. Клемпарская, Н.Н. Инфекция и иммунитет у облученных организмов / Н.Н. Клемпарская, Р.В. Петров // Радиационная медицина / Под ред. А.И. Бурназяна и Л.В. Лебединского. - М.: Госатомиздат., 1963. - С. 232-256.

9. Мальцев, В.Н. Влияние бактериальных препаратов на выживаемость облученных животных / В.Н. Мальцев, К.К. Гуценко, Н.В. Емченко // Радиационная биология, радиозкология, 1994. - Т. 34. - Вып. 4-5. - С. 578-581.

10. Боченков, В.Ф. Радиобиология. Радиационная безопасность сельскохозяйственных животных / В.Ф. Боченков, А.В. Васильев, Г.А. Донская, Е.Г. Жуков, Л.Л. Захарова, В.В. Ивановцев, Н.Н. Исамов, М.В. Калмыков, В.А. Киршин, Е.А. Маяков, Ю.Я. Михайлов, Е.В. Спиринов, Л.М. Сургучева, Е.И. Трошин, Н.А. Шкаева // Учебное пособие для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальностям «Зоотехния», «Ветеринария» / Под редакцией В.А. Бударкова, А.С. Зенкина, г. Москва 2008. - Сер. Учебники и учебные пособия для студентов высших учебных заведений.