

*Раззаков Набижон Алижанович*

*доцент, PhD, кафедра медицинской химии*

*АГМИ, Республика Узбекистан*

*Отабекова Мохира Уйгунбек кизи*

*Студенка фармацевтического факультета*

*АГМИ, Республика Узбекистан*

*Мамадалиева Хилолахон Хамиджановна*

*Младшая научная сотрудница ADVTBTES*

*Республика Узбекистан*

## **IN VITRO ИССЛЕДОВАНИЕ РОСТА И РАЗВИТИЯ БИФИДОБАКТЕРИЙ В СОСТАВЕ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ**

**Аннотация:** На этой статье проводились эксперименты и даны результаты *in vitro* исследования роста и развития бифидобактерии, такие как, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis* в составе взрослых и детских препаратов. Для исследования мы использовали две питательные среды и разные pH среды (1,6; 6,8; 7,4; 8,2). Результаты показали негативное влияние среды желудочного сока (pH=1,5-2) и оптимальность среды двенадцатиперстной кишки (pH=5,6-7,9) на рост и развития бифидобактерий. Бифидум-среда является оптимальной средой для размножения наших исследуемых бифидобактерий.

**Ключевые слова.** *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, Бифидум-среда, бульон *Bifidobacterium Broth*, pH среда, микрофлора, КОЕ/мл.

**Razzakov Nabizhon Alizhanovich**

**Associate Professor, PhD, Department of Medical Chemistry**

**ASMI, Republic of Uzbekistan**

**Otabekova Mohira Uygunbek kizi**

**Student of the Faculty of Pharmacy**  
**ASMI, Republic of Uzbekistan**  
**Mamadaliyeva Khilolakhon Khamidzhanovna**  
**Junior Research Fellow ADVTBTES**  
**The Republic of Uzbekistan**

**Annotation.** Experiments were conducted on this article and the results of in vitro investigation of the growth and development of bifidobacteria, such as *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis* in adult and children's preparations were given. For the study, we used two nutrient media and in different pH media (1,6; 6,8; 7,4; 8,2).

The results showed a negative effect of gastric juice (pH=1.5-2) and the optimality of the duodenal environment (pH=5.6-7.9) on the growth and development of bifidobacteria. The bifidum medium is the optimal environment for the reproduction of our studied bifidobacteria.

**Keywords.** *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, Bifidum medium, Bifidobacterium Broth, pH medium, microflora, CFU/ml.

Актуальным вопросом стоящих перед клиницистами, является вопрос о том, как сохранить нормальную микрофлору человеческого организма. При этом необходимо изучить своевременную проблему медицины, такой как, синдром дисбактериоза. Пробиотики занимают одно из ведущих мест в коррекции дисбиотических нарушений микрофлоры кишечника. Микрофлора кишечника грудного ребенка почти на 90% состоит из бифидобактерий. По мере грудного вскармливания бифидофлора заменяется стандартной кишечной флорой, которая характерна для взрослых организмов и состоит из нескольких сотен видов бактерий. Микрофлора толстого кишечника включает как минимум от 400 до 500 различных видов бактерий, примерно 10<sup>14</sup> клеток [1]. Формирование состава кишечной микрофлоры происходит в детстве [2].

Бифидобактерии это грамположительные анаэробные бактерии входящий в состав полезной микрофлоры кишечника человека, представленной большими сообществами микроорганизмов. Отсутствием этих бактерий невозможно полноценное функционирование пищеварительной системы человеческого организма. Недостаточное количество приводит к развитию болезни дисбактериоза. Кроме того, бифидобактерии разрушают и предотвращают накопление в кишечнике вредных продуктов обмена других микроорганизмов индола, скатола, фенолов, а также биогенных аминов, обладающих канцерогенным действием. Детоксицирующую активность кишечных бактерий исследователи приравнивают к деятельности печени [3].

В этой связи представлялось изучить препараты для человеческого организма, которые назначаются лечащим врачом пациентам. Наши препараты имеют пробиотики *Bifidobacterium* spp: *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*). Началом нашего эксперимента было приготовление питательных сред для исследуемых бактерий. Существуют селективные среды для бифидобактерий [4]. Но поскольку род *Bifidobacterium* включает более 30 видов, отличающихся значительной гетерогенностью в отношении устойчивости к противомикробным препаратам и другим ингибиторам [1], сложно разработать одну среду с высокой селективностью при сохранении хорошей степени выделения. Поэтому в лабораторной практике чаще используют неселективные питательные среды. В качестве питательной среды для бифидобактерий приготовили бульон модифицированный с 0,1% агаром *Bifidobacterium Broth* (M1395A), а также Бифидум-среду для сравнения и определения благоприятной среды. Готовили эталоны нам нужного рН среды и сопоставляли его с приготовленными нами средами. Для изменения рН среды с градуированной пипеткой прибавили по каплям децинормальный раствор едкого натра для подщелачивания и

децинормальный раствор хлористоводородной кислоты для подкисления до тех пор, пока цвет содержимого в опытной и стандартной пробирках не совпадет полностью. За изменением цвета опытных пробирках наблюдали все время через отверстие, расположенное на передней стенке у основания штатива[5]. Затем налили в лошадиные пробирки (20мл) и отправили для полной стерилизации в автоклав (СТЕРИЛИЗАТОР ПАРОВОЙ ВК-1501) с многопеременным индикатором (ГОСТ ISO 11140-1). Индикатор изменил свой цвет с фиолетового на зеленый. Это является доказательством готовности наших питательных сред. Готовые среды взяли из автоклава и оставили в комнатной температуре. Загустевшие среды отправили в помещение, где проводим следующую основную нашу работу [6].

Для определения количества бифидобактерии взяли два препарата. Один из этих пробиотиков является для взрослых, второй для детей. Оба они применяются в виде капсулы. Взяли 25 капсул и отмерили 1гр для приготовления матричной пробирки [6]. Из матричных пробирок начали разбавлять наши растворы до седьмой пробирки и из этой пробирки делали посев на наши среды. Бифидум среда и бульон модифицированный с 0,1% агаром Bifidobacterium Broth были уже в лошадиных пробирках готовыми для посева. Каждая наша среда имела 4 разных рН сред соответствующие на человеческую пищеварительную систему. После посева их оставили в инкубаторе DH210L на 35 ° С в течении 48ч. Образовались множество колоний в наших пробирках в виде помутнений. Окрасили по Грамму и подсчитали их КОЕ/мл. Расчёты показаны ниже в таблицах 1 и 2:

***Таблица 1. Чувствительность и эффективность КОЕ/мл в составе пробиотика для взрослых***

№	рН среда	Бифидум-среда	Бульон Bifidobacterium Broth
1	1,6	5,4x10 <sup>5</sup>	3,6x10 <sup>5</sup>

<b>2</b>	<b>6,8</b>	<b>6,7x10<sup>8</sup></b>	<b>3,5x10<sup>8</sup></b>
<b>3</b>	<b>7,4</b>	<b>4,5x10<sup>9</sup></b>	<b>3,8x10<sup>8</sup></b>
<b>4</b>	<b>8,2</b>	<b>8,9x10<sup>8</sup></b>	<b>8,2x10<sup>7</sup></b>

Результаты нашего исследования показали что в наших двух средах росли колонии различного количества. С рН(1,6; 6,8; 7,4; 8,2) КОЕ/мл в Бифидум среде составила  $5,4 \times 10^5$ ,  $6,7 \times 10^8$ ,  $4,5 \times 10^9$ ,  $8,9 \times 10^8$  а в Бульон Bifidobacterium Broth составила  $3,6 \times 10^5$ ,  $3,5 \times 10^8$ ,  $3,8 \times 10^8$ ,  $8,2 \times 10^7$ . Это доказывает что Бифидум-среда является более благоприятной для роста наших колоний.

**Таблица 2. Чувствительность и эффективность КОЕ/мл в составе пробиотика для детей**

<b>№</b>	<b>рН среда</b>	<b>Бифидум-среда</b>	<b>Бульон Bifidobacterium Broth</b>
<b>1</b>	<b>1,6</b>	$3,4 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$
<b>2</b>	<b>6,8</b>	$5,7 \times 10^8$	$2,4 \times 10^8$
<b>3</b>	<b>7,4</b>	$3,2 \times 10^9$	$1,8 \times 10^8$
<b>4</b>	<b>8,2</b>	$7,9 \times 10^8$	$7,2 \times 10^7$

Детский препарат содержит менее количество бифидобактерий, чем взрослый препарат. Среда показали результат как на предыдущей таблице.

**Вывод.** Исследования показали, что бифидобактерии критически уменьшали рост в кислой среде. При этом можно узнать отрицательное действие желудочного сока на развитие пробиотиков. Нами изученной в щелочной среде, также можем узнать негативное влияние среды. Оптимальными средами для жизнедеятельности и увеличения пробиотиков являются нейтральные и слабощелочные среды. Изучена выживаемость бифидобактерий, составляющих основу пробиотических препаратов в условиях *in vitro*. С помощью этих данных можем узнать влияние рН среды человеческого организма на жизнедеятельность

бифидобактерий. Проведенные испытания показали негативное влияние желудочного сока (pH=1,5-2) и оптимальность среды двенадцатиперстной кишки (pH=5,6-7,9). Также исследования показали, что Бифидум-среда является более благоприятным для роста и развития наших бифидобактерий. Причем, сравнение нашей Бифидум-среды с широко используемой бульоном модифицированной 0,1% агаром Bifidobacterium Broth обнаружено некоторые преимущества.

### Литературы

1. Zoetendal E.G., Rajilić-Stojanović M. and de Vos W.M. High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota // *Gut*. 2008. Vol. 57, N 11 P. 1605–1615.
2. Favier C.F., Vaughan E.E., De Vos W.M., Akkermans A.D.L. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates // *Applied and Environmental Microbiology*. 2002. Vol. 68, N 1. P. 219–226.
3. Biavati B., Mattarelli P. The family Bifidobacteriaceae. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt E., editors. *The prokaryotes*. 3rd ed. New York: Springer. 2006. Vol. 3. P. 322–382.
4. Л.В.Домотенко, А.Б.Шепелин // Бифидум среда для выделения и культивирования бифидобактерий // *Инфекция и иммунитет*, 2014, Т.4 №3, с. 279-283
5. А. С. Лабинская // *Микробиология с техникой микробиологических исследований* // Москва, «Медицина» 1978. 40-41 с.
6. Государственная фармакопия Украины // Харьков, Научно-экспертный фармакопейный центр, 2004 . 672 с.