

ՀՀ ԳԱԱ «ՀԱՅԿԵՆՍԱՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱ» ԳԱԿ ՊՈԱԿ

ԴԱՆԻԵԼ ՅԱՆ Լ ՈՒՍԻՆԵ ՎԱԶԳԵՆԻ

**ՄԱՅՐԱԿԱՆ ԿԱԹՈՑ ՊՐՈԲԻՈՏԻԿ ԲԱԿՏԵՐԻԱԼԵՐԻ ԱՆՁԱՏՈՒՄԸ ԵՎ
ԲՆՈՒԹԱԳՐՈՒՄԸ**

**Գ.00.07 - «Միկրոբիոլոգիա կենսաառեխնոլոգիա» մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայ ցման ատենախոսություն**

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ 2017

НПЦ «АРМБИОТЕХНОЛОГИЯ» НАН РА ГНКО

ДАНИЕЛЯН ЛУСИНЕ ВАЗГЕНОВНА

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ ИЗ
МАТЕРИНСКОГО МОЛОКА**

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.00.07 - «Микробиология. биотехнология»**

ЕРЕВАН 2017

Անտեսախոսութեան թեման հաստատուել է ՀՀ ԳԱԱ
«Հայ կենսաառնակաբանական գիտություն» ԳԱԿ-ում:

Գիտական ղեկավար՝ Կ.Գ.Դ., պրոֆեսոր Յ.Գ.
Հովհաննիսյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ Կ.Գ.Դ., պրոֆեսոր Ս.Մ.
Բադալյան

Կ.Գ.Թ. Ս.Ղ. Զելեչյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ Երևանի Մ.
Հերացու անվան

պետական բժշկական

համալսարան

Անտեսախոսութեան պաշտպանութեանը կայանալու է 2017թ.
դեկտեմբերի 22-ին, ժամը 15⁰⁰ - ին ՀՀ ԳԱԱ «Հայ կենսաառնակաբանական գիտություն»
ԳԱԿ-ում գործող ՀՀ ԲՈՀ-ի Կենսաառնակաբանական գիտության 018
մասնագիտական խորհրդի նիստում:

Հասցե՝ 0056, ՀՀ, ք. Երևան, Գյուրջյան փողոց, 14, հեռ./ֆաքս (374 10)
65 41 80:

Անտեսախոսութեանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ
«Հայ կենսաառնակաբանական գիտություն» ԳԱԿ-ի գրադարանում:

Սեղմագիրն առաքված է 2017թ. նոյեմբերի 22-ին:

Մասնագիտական խորհրդի
գիտական քարտուղար, Կ.Գ.Թ.
Ավետիսյան



Գ.Ե.

Тема диссертации утверждена в НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА.

Научный руководитель: д.б.н., профессор Г.Г. Оганесян

Официальные оппоненты: д.б.н., профессор С.М. Бадалян
к.б.н. С.К. Келешян

Ведущая организация: Ереванский государственный медицинский
университет имени М. Гераци

Защита диссертации состоится 22 декабря 2017г. в 15⁰⁰ часов на заседании
специализированного совета 018 Биотехнологии ВАК РА при НПЦ
«Армбиотехнология» НАН РА.

Адрес: 0056, РА, г. Ереван, ул. Гюрджяна 14, тел./ факс (374 10) 65 41 80.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НПЦ «Армбиотехнология»
НАН РА.

Автореферат разослан 22-го ноября 2017г.

Ученый секретарь специализированного совета,
к.б.н.



Է. Ավետիսովա

ՍԵՒԱՏԱՆՔԻ ԸՆԴՀԱՆՈՒՐ ԲՆՈՒԹԱԳԻՐԸ

Առեւտրական թեմայի արդիականությունը

Կաթնաթթվային բակտերիաները լայնորեն տարածված են մարդու աղեստամոքսային և միզատեսակների համակարգերում: Աղիքային միկրոֆլորան կարևոր դեր է խաղում մարդու հումորալ իմունիտետի բարձրացման և հարուցիչների դեմ պայքարի գործում: Համաձայն միևնույն վերջերս գոյություն ունեցող կարծիքի, աղիքային միկրոֆլորան ձևավորվում է ինքնաբերական սննդակարգի, առօրյա ազդեցության, կլիմայական և այլ գործոնների ազդեցության տակ, սկսած մարդու կյանքի առաջին օրերից մինչև հասուն տարիք: Սակայն, ինչպես ցույց տվեցին վերջին հետազոտությունները աղիքային միկրոֆլորայի ձևավորման գործում առաջնային դեր են խաղում մայրական կաթում հայտնաբերված օգտակար մանրէները [Marwa K.S., at al, 2015, Martin V., at al, 2012]: Մայրական կաթի ժամանակավոր միկրոֆլորան սկսվում է ձևավորվել հղիության երրորդ եռամսյակում և անհետանում է լակտացիայի ավարտին: Մայրական կաթի մանրէների գլխավոր աղբյուր է հանդիսանում կնոջ աղիքային միկրոֆլորան, որը կրծքագեղձեր է տեղափոխվում իմունային բջիջների միջոցով, այսպես կոչված անդրկաթնագեղձային անցուղիով [Fernandez L., at al., 2013]: Մայրական կաթի միկրոֆլորայի կազմը կախված է ժամանակահատվածից, մոր սննդակարգից, դեղորայքի օգտագործումից, բնակլիմայական պայմաններից, առօրյա ազդեցության դիրքից և այլն [Cabrera-Rubio R., at al., 2012]: Աշխարհի տարբեր երկրներում հետազոտություններ են տարվում մայրական կաթի միկրոֆլորայի բազմազանության որոշման ուղղությամբ [Federoco L.V., at al. 2007, Perez-Caro F.J., at al. 2007, Martin R., at al., 2012, Federico L.V., at al., 2007, Sinkiewicz G., 2008]: Հայաստանական կերակրող կանանց մոտ մայրական կաթի այդպիսի հետազոտություններ մինչև այժմ չեն իրագործվել, ինչը շատ հեռանկարային է հղիության շրջանում կրծքում ձևավորվող միկրոֆլորայի վրա ազդելու և հետագայում նորածինների աղեստամոքսային համակարգի միկրոֆլորայի կազմավորման գիտապրակտիկ հայեցակարգի մշակման համար:

Հետազոտության նպատակը և խնդիրները

Հայաստանական առողջ կանանց մայրական կաթից կաթնաթթվային բակտերիաների անջատումը, ուսումնասիրումը, պրոբիոտիկ ներուժ ունեցող շտամների առանձնացումը և հետագայում որպես պրոբիոտիկներ կիրառումը մանկաբուժության և բժշկության մեջ:

Խնդիրներն են՝

1. Հայաստանական կանանց մայրական կաթի նմուշներից կաթնաթթվային բակտերիաների մաքուր կուլտուրաների անջատումը:

2. Անջատված ԿԹԲ-ների մորֆո-ֆիզիոլոգիական, կուլտուրալ, մետաբոլիկ հատկությունների ուսումնասիրումը և նույնականացումը ըստ բերքի բակտերիաների որոշիչի:

3. Ընտրված շտամների մոլեկուլային գենետիկական նույնականացում RAPD ՊՇՌ-մեթոդով և ավանդադրումը:
4. Անջատված ԿԹԲ-ների հակամանրեային հատկությունների և հակաբիոտիկների հանդեպ կայունությունների անջատված կաթնաթթվային ԿԹԲ-ների պրոտեոլիտիկ ակտիվություն, աճման և կաթի մակարդման արագություն անորոշումը:
6. Մայրական կաթի ռեզիդենտմիկրոֆլորայի պահվածքի ուսումնասիրությունը.

- կրծքում *in vivo*, կախված լակտացիայի փուլերից և կերակրման ցիկլից

- կովի կաթում *in vitro*

- մայրական կաթում *ex vivo*

7. Սինթիոտիկների ստեղծելու նպատակով սինթետիկ և բնական պրոբիոտիկների ազդեցության ուսումնասիրությունը անջատված կաթնաթթվային բակտերիաների աճի և կենսունակության պահպանման վրա:

Գիտական նորույթը

Հաստատվել է հայաստանական առողջ կանանց կրծքի կաթում պրոբիոտիկ միկրոօրգանիզմների բարձր քանակությունների ~10⁹ ԳԱՄ/մլ առկայությունը: Կրծքի կաթից անջատված միկրոօրգանիզմների մեծամասնությունը համաձայն ֆենոգենետիկական նույնականացման ըստ Բերջիի բակտերիաների որոշիչի և RAPD ՊՇՌ տվյալների իրենցից ներկայացնում են լակտոկոկեր կամ լակտոբացիլներ: Մեր կողմից հետազոտվել է մայրական կաթում ժամանակավոր միկրոբիոտայի քանակական և որակական փոփոխությունները լակտացիայի տարբեր շրջաններում *in vivo* և *ex vivo* պայմաններում, որոնց արդյունքում հայտնաբերվել է, որ առողջ կանանց կրծքի կաթում կաթնաթթվային բակտերիաները հանդես են գալիս որպես գերակշռող տեսակներ: Առաջին անգամ ցույց է տրվել, որ կրծքի կաթում առկա կաթնաթթվային բակտերիաները, ի տարբերություն կովի կաթի, չեն մակարդում մայրական կաթը, այն դեպքում երբ *ex vivo* պայմաններում ինտենսիվ բազմանում են գոյացնելով 10¹¹ ԳԱՄ/մլ, երբեմն մեկ, երկու տեսակներից կազմված պոպուլյացիա: Սինթիոտիկ կենսապատրաստուկներ ստեղծելու նպատակով ուսումնասիրվել է լակտոլոզի և բուսական ծագման կամեդների ազդեցությունը մայրական կաթից մեկուսացված լակտոբացիլների աճի վրա: Առաջին անգամ ցույց է տրվել սենեզալյան ակացիայի և ծիրանենու կամեդում մանրէների կողմից յուրացվող (15~20%) և մանրեային բջիջները կոնսերվացնող ֆրակցիաների առկայությունը:

Աշխատքի կիրառական նշանակությունը

Առավել բարձր պրոբիոտիկ և տեխնոլոգիական հատկություններով օժտված ԿԹԲ-ների շտամներ պարունակող կենսապատրաստուկները կարելի է օգտագործել հղիության երրորդ եռամսյակում կանանց կրծքագեղձերի գաղութացման համար: Ընտրված շտամները՝ բնական և պրոբիոտիկ

պրեֆիոտիկների հետ միաժամանակ, կարելի է կիրառել մանկական սննդում աղիների կենսաագործունեության բարելավման և օգտակար միկրոֆլորայի պահպանման նպատակով: Պրոտեոլիտիկ բարձր ակտիվության օժտված շտամների օգտագործումը մանկական կաթնային խառնուրդներում կնպաստի կազեինների յուրացմանը և կնվազեցնի նրանց բացասական ազդեցությունն երեխայի աղեստամոքսային համակարգի գործունեության վրա:

Կարգ գիտական թեմաների հետ

Աշխատանքն իրականացվել է ՀՀ Կրթության և գիտության նախարարության Գիտության պետական կոմիտեի բազային ֆինանսավորման միջոցներով:

Հեղինակի անձնական ներդրումը

Հեղինակի անձնական ներդրումն է՝ նմուշառումը, շտամների անջատումը, նրանց մորֆո-ֆիզիոլոգիական, կուլտուրալ և մետաբոլիկ հատկությունների ուսումնասիրումը, անջատված շտամների նույնականացումն ըստ Բերջիի բակտերիաների որոշիչի: Բարձր պրոտեոլիտիկ և հակամանրէային հատկությամբ օժտված շտամների ուսումնասիրումը, նրանց անձնական փոխազդեցության որոշումը բուսական և արհեստական պրեֆիոտիկների հետ: Աշխատանքին առնչվող գիտական հոդվածների վերլուծությունն և ատենախոսության ձևակերպումը: Հետազոտությունների պլանավորումը, մեթոդների մշակումը, ստացված արդյունքների ամփոփումը կատարվել են գիտական ղեկավար Կ.Գ.Պ. պրոֆեսոր Յ.Գ. Հովհաննիսյանի հետ համատեղ:

Աշխատանքի քննարկումը

Ատենախոսության արդյունքները գեկուցվել են միջազգային գիտաժողովներում՝ The 2nd International Scientific Conference of Young Researchers on “Contribution of the Young Generation in the Development of Biotechnology”, October 1-4, 2013, Yerevan Armenia, “Trends in Microbiology and Microbial Biotechnology”, International Scientific Workshop, October 5-8, 2014, Yerevan Armenia, III International Scientific Conference of Young Researchers: Dialogues on Science, June 23-26, 2015, The 4th International Scientific Conference of Young Researchers on “Biotechnology. Science and Practice” September 28-30, 2017, Yerevan Armenia, «Կանանց նվաճումները կենսաբանական գիտությունների ոլորտում» II միջազգային գիտաժողով, հոկտեմբերի 10-12, 2017, Երևան, Հայաստան և «Հայ կենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի գիտական խորհուրդի նիստերում:

Տարգրված աշխատանքները

Ատենախոսության արդյունքները հրատարակվել են 5 միջազգային և հանրապետական գիտական ամսագրերում՝ հոդվածների ձևով, 4 միջազգային գիտաժողովների թեզիսների ժողովածուներում:

Աշխատանքի իրականացման վայրը

Աշխատանքը կատարվել է ՀՀ ԳԱԱ «Հայ կենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի կաթնաթթվային բակտերիաների և շաքարասնկերի, այժմ՝

սննդի կենսաանվտանգության և աբորատորիայում, իսկ մոլեկուլային գենատիպավորումը Ստանդարտ դիպոզիտներում:

Աշխատանքի ծավալը և կառուցվածքը

Ատենախոսությունը բաղկացած է ներածությունից, գրական ակնարկից, նյութեր և մեթոդներից, փորձարարական մասից, ամփոփումից, եզրակացություններից, գրականության ցանկից, հապավումների ցանկից և երկու հավելվածներից: Աշխատանքը շարադրված է 103 էջի վրա, ներառում է 27 աղյուսակ, 12 նկար և 183 գրական հղում:

ԳԼՈՒԽԼ. ԳՐԱԿԱՆ ԱԿՆԱՐԿ

Գրական ակնարկում կատարվել է ամփոփիչ վերլուծություն նախքան երկրներում անցկացված հետազոտությունների հիման վրա մայրական կաթում կաթնաթթվային բակտերիաների քանակի, բազմազանության և տարածվածության վերաբերյալ:

ԳԼՈՒԽԼ. ՆՅՈՒԹԵՐ ԵՎ ՄԵԹՈԴՆԵՐ

Կաթնաթթվային բակտերիաների շտամները անջատվել են այս աշխատանքում: Օգտագործել ենք նաև թեստ շտամներ՝ *Escherichia coli* MDC 5003, *Candida albicans* MDC 8013, *Staphylococcus aureus* MDC 5233, որոնք ստացվել են ՀՀ ԳԱԱ «Հայ կենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ - ի մանրէների ավանդադրման կենտրոնից: Սննդային միջավայրեր և նյութեր՝ LAPT ցազար և արգանակ, մոդիֆիկացված LAPT-M տրիպտոգ ցազար (Ferak Berlin), և ինքնաբերական արգանակ՝ Nutrient broth standart 1(NB)(Serva), MRS և M16 ցազար (Himedia, India), Էյկմանի միջավայրը, Սաբուրո ցազար (Serva, Berlin), յուղագերծ կաթ: Նյութերը՝ մեթիլեն կապույտ, Լեդի (Micromaster), գրամի ներկման հավաքածու (Gram Staining Set, Ghatran, IIR), ջրածնի պերօքսիդ (H_2O_2), օքսիդացային սկավառակներ (Himedia, India), L- արգինին (Sigma), ածխաջրեր, թթու ֆուքսին, ֆենոլ ֆթալեին, քսիլոլ (Kemika, Croatia), գումիարաբիկ (*Acacia senegal* L.) (Acacia, NF, Medisca, USA), ծիրանենու կամեդ (*gummi armeniaceae*.) (ԵՊԲՀ Ֆարմակոգնոզիայի ամբիոն), Լակտուլոզ (Solvay pharma, Duphalac), Անդրեդեի ինդիկատոր, Նեսսլերի ռեակտիվ, հակաբիոտիկներով թղթ սկավառակներ (Serva, ԳԴՀ):

Կրծքի կաթի նմուշները վերցվել են պահպանելով ասեպտիկայի բոլոր կանոնները՝ նախորոք օճառով և ջրով լվացվել են ձեռքերը, հետո կրծքի արեոլն և պտուկը, քլորհեքսիդին գլյուկոնատի 0.1% լուծույթով և սրբվել մանրէազերծ թանգիվով: Մոտ 0.5 մլ կաթը թափվել է մաշկից անցած ադտոտվածությունից խուսափելու համար, այնուհետև արտազվել է ստերիլ փորձանոթի մեջ, տեղադրվել սառույցով տարայի մեջ: Կուլտիվացվող բակտերիաների քանակը որոշվել է տառաապատիկ նոսրացումները հալեցված ($46^{\circ}C$) ցազարի հետ

խառնելու և թափկի մեջ լցնելու մեթոդով (Pour plate method): Մանրէների տիտրերը որոշվել է նաև նոսրացումներից ինոկուլացված ֆերմենտացված կաթերի նմուշների քանակով: Մաքուր կուլտուրաների անջատման համար մայրական կաթի նմուշներից կատարվել է ցանքս MRS սելեկտիվ ագարային միջավայրի վրա, պատահական (ռանդոմային) եղանակով անջատվել են գաղութներ, որոնց մոտստուգվել են կովի կաթը մակարդելու ընդունակությունը, գրամով ներկվելու ունակությունն ու կառավազային ռեակցիաները: Աճի արագությունը որոշվել է գիշերային կուլտուրաների 1:20 MRS արգանակում նոսրացումները երկենմայրերի 200 մլ անոթներում ճոճանակով ջրային բաղնիքում 37°C ջերմաստիճանում ինկուբացման և օպտիկական խտությունը \$E_{426}\$ ֆոտոկոլորիմետրով, 590 նմ ալիքի երկարության տակ: ԿԹԲ-ների կայունության որոշումը 4% - 6.5% NaCl պարունակող MRS արգանակում և 2% - 4% լեղիով կաթում որոշվել է հայտնի մեթոդներով: ԿԹԲ - ների կայունությունն 0.1 % մեթիլեն կապույտի նկատմամբ և արգինինից ամիակի առաջացումն որոշվել են հայտնի մեթոդով, իսկ ջերմակայունությունն որոշվել է 4 – 60°C տիրույթում: Կառավազային ակտիվությունը որոշվել է հայտնի մեթոդով, իսկ հակամանրեային ակտիվությունն որոշվել է վերնստվածքային հեղուկներով թրջված թղթե սկավառակները տեղադրելով թեստ-կուլտուրաներով ինոկուլացված տրիպտոգ ագարի վրա: ԿԹԲ - ների կողմից ածխաջրերի յուրացումն որոշվել է տարբեր ածխաջրեր և Անդրեդեի ինդիկատոր պարունակող LAPT-M ագարային միջավայրում աճով և վարդագույն երանգավորումով: Պրոտեոլիտիկ ակտիվությունը որոշվել է Էյկմանի ագարային միջավայրի մակերեսին թափանցիկ գոտիների (պրոտեոլիզի) մեծությամբ: Հակաբիոտիկների նկատմամբ կայունությունը և զգայունությունը որոշվել է սկավառակներով դիֆուզիայի մեթոդով: Տիտրացվող թթվայնությունը որոշվել է ըստ Թյորների, իսկ pH –ը HANNA pH-մետրի օգնությամբ: Մոլեկուլային նույնականացումը կատարվել է RAPD ՊՇՌ մեթոդով:

Ստացված տվյալների վիճակագրական մշակումը: Բոլոր փորձերը կատարվել են 3-5 կրկնությամբ և ստացված տվյալները ենթարկվել են հավաստիության գնահատման վիճակագրական մշակման ըստ Ստյուդենտի թեստի և օգտագործվել է R Project for Statistical Computing version R 3.1.1 ծրագրի: Ստացված արդյունքների գրաֆիկական կառուցումը կատարվել է Microsoft Office Excel համակարգչային ծրագրով: Աշխատանքում ստացված տվյալները համարվում են հավաստի $p < 0.05$, եթե աշխատանքում այլ արժեքներ չեն դիտարկվել:

ԳԼՈՒԽՅ. ՓՈՐՁԱՐԱՐԱԿԱՆ ՄԱՍ

3.1. Կաթնաթթվայ ին բակտերիաների մաքուր կուլ տուրանների ստացումը

Պահպանելով ասեպտիկայի և անտիսեպտիկայի կանոնները 23 կլ ինիսկորեն առողջ 22-28 տարեկան ծնողականներից վերցված կաթի նմուշները նոսրացումներով ցանվել են ստերիլ կովի կաթում, սելեկտիվ ագարային LAPTg, MRS և ոչ սելեկտիվ NB միջավայրերում, վերջինս ցանվել են ԿԹԲ-ներից բացի այլ միկրոօրգանիզմների հայտնաբերման համար, այնուհետև մայրական կաթի նմուշի հետ ինկուբացվել 1 – 3 օր 37°C – ում: Բոլոր միջավայրերում և կովի կաթում մանրէների հավասարաճը վկայում է ԿԹԲ-ների գերակայության մասին: Հայաստանաբնակ կանանց կրծքի կաթում ԿԹԲ-ների քանակները տատանվում են 2.0×10^4 և 1.0×10^5 ԳԱՄ/մլ, որը համընկնում է գրականությանում ներկայացված տվյալների հետ [Fernandez L., 2013, Farhana S.D., 2013]: ԿԹԲ-ների մաքուր շտամներն անջատվել են բարձր նոսրացումներից սելեկտիվ միջավայրերի վրա աճած գաղութներից պատահական ընտրության մեթոդով: Գրամդրական և կատալազա բացասական շտամները առանձնացվել են հետագա ուսումնասիրությունների համար: Ընտրված 20 գրամդրական շտամների մանրադիտակային ուսումնասիրությունը ցույց տվեցին, որ 12 - ը կոկեր են (60%), իսկ 8 - ը ցուպիկներ (40%): Անջատված շտամները տարբերվում են ինչպես իրենց գաղութների և բջիջների չափերով, այնպես էլ մոնոկուլտուրայով կաթը ֆերմենտացնելու ունակությամբ:

3.2. Լակտոբացիլների նույնականացումը ըստ Բերջիի բակտերիաների որոշիչի

Նախ և առաջ ուսումնասիրվել են անջատված և ակտոբացիլային շտամների կուլտուրալ և ֆիզիոլոգիոկենսաքիմիական հատկությունները (Աղ. 1-ում):

Աղյուսակ 1. Լակտոբացիլների ֆիզիոլոգիական և կուլտուրալ հատկությունները

ԿԹԲ	Աճը տարբեր °C-ում			Աճը NaCl, %		Աճը pH-ում		Աճը լեղիով կաթում, %		0.1%-ոց ՄԿ	Արգինինից NH ₃ -ի առաջացում
	10	45	50	4.0	6.5	2	9,2	2	4		
LH14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
LH15	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
LH25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
LH26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
LH27	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LH28	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
LH29	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
LH32	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+

ՄԿ- աճը 0.1% մեթիլ են կապույտով կաթում

Ինչպես երևում է աղյուսակ 1-ից, 10°C-ում աճը բացակայում է լակտոբացիլների երեք շտամների մոտ, 45°C և 50°C ջերմաստիճաններում աճում են բոլոր շտամները բացի 1-ից, pH 2 – 9.2 –ի և 2% - 4% լեղիով կաթում կայուն են բոլոր շտամները: 0.1% մեթիլ են կապույտ պարունակող կաթում աճում է միայն մեկ շտամ, լակտոբացիլների միայն երկու շտամ է զգայուն 6.5% NaCl-ի հանդեպ: Արգինինից ամոնիակ առաջացնում են բոլոր լակտոբացիլային շտամները:

Լակտոբացիլների կողմից կաթի մակարդման արագության ու մակարդի տիտրացվող թթվայնության (ըստ Թյորների - °T) որոշման արդյունքում պարզվեց, որ LH15 շտամը կաթը մակարդում է 5, LH27, LH28, LH29 շտամները՝ 8, իսկ մնացածը շտամները 24 ժամվա ընթացքում՝ առաջացնելով պինդ և համասեռ մակարդուկներ: Առավել բարձր թթվությունը օժտված են LH25 և LH27 շտամների (118 և 120 °T) մակարդները: Աղյուսակ 2-ում ներկայացված են լակտոբացիլների կողմից 18 տարբեր ածխաջրերի յուրացման պրոֆիլը:

Աղյուսակ 2. Լակտոբացիլների ածխաջրերի յուրացման պրոֆիլը

ԿՑԲ	Արաբինոզ	Ցելոբիոզ	Ֆրուկտոզ	Գալակտոզ	Գլյուկոզ	Լակտոզ	Մալտոզ	Մաննիտ	Մեխիտոլ	Մեդիոլ	Բաֆինոզ	Բաժմոզ	Դիքոզ	Սաիտին	Սորբիտ	Սախարոզ	Տրեալոզ	Բիոլոզ
LH14	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
LH15	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+
LH25	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
LH26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-
LH27	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
LH28	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+
LH29	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
LH32	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-

Ինչպես երևում է աղյուսակից բոլոր 8 լակտոբացիլային շտամները ունեն ածխաջրերի յուրացման տարբեր ունակություններ:

Անջատված լակտոբացիլների կուլիտուրալ և մետաբոլիկ հատկությունների վերլուծության հիման վրա կատարվել է անջատված լակտոբացիլների (Աղ. 2, 3) նախնական դասակարգում համաձայն Բերքիի բակտերիաների որոշիչի, որը հաստատվել է RAPD ՊՇՌ մեթոդով անցկացված նույն նականացման միջոցով (Աղ. 3 և Հավելված 2):

Աղյուսակ 3. Լակտոբացիլների նույն նականացումը

ԿԹՔ շտամը	ԿԹՔ տեսակին համապատասխանությունը	Համապատասխանության մակարդակը, %
LH14	<i>L. delbrueckii</i>	94/95
LH15	<i>L. fermentum</i>	97/99
LH25	<i>L. casei</i>	99/100
LH26	<i>L. casei</i>	100
LH27	<i>L. salivarius</i>	81/98
LH28	<i>L. casei</i>	93
LH29	<i>L. casei</i>	99
LH32	<i>L. reuteri</i>	84/95

Ինչպես երևում է աղյուսակից մեր կողմից ուսումնասիրված հայաստանաբնակ կանանց կրծքի կաթի նմուշներում առավել հաճախ ներկայացված է *Lactobacillus casei* տեսակը:

3.3. Մայրական կաթից անջատված լակտոկոկերի նույն նականցումը համաձայն Բերքիի բակտերիաների որոշիչի

Մանրադիտակային ուսումնասիրությունները ցույց տվեցին, որ անջատված լակտոկոկերը տարբերվում են չափսերով և շղթաներ առաջացնելու ունակությամբ: Նրանց կողմից առաջացրած գաղութները նույնպես տարբերվում են ինչպես տեսքով ու գույնով, այնպես էլ չափսերով: Գաղութները բաժանվում են 5 հիմնական խմբերի՝ սպիտակ փոքր 0.5 – 1.3 մմ, սպիտակ միջին 1 – 1.5 մմ, թափանցիկ փոքր 1.0 – 1.2 մմ, կաթնագույն մանր 0.5 – 1.5 մմ և կաթնագույն խոշոր 1.5 – 1.8 մմ տրամագծերով: Անջատված բոլոր լակտոկոկերը մոնոկուլիտուրայով ընդունակ են ֆերմենտացնելու կովի կաթը, սակայն գիջում են ցուպիկային շտամներին մակարդման արագությամբ և մակարդուկների թանձրությամբ: Լակտոկոկերի կուլիտուրալ և ֆիզիոլոգիական հատկությունները ներկայացված են Աղ. 4-ում:

Աղյուսակ 4. Լակտոկոկերի կուլիտուրալ և ֆիզիոլոգիական հատկությունները

ԿԹԸ	Աճը տաքրեք °C-ում				Աճը NaCl, %		Աճը pH-ում		Աղիով կաթում %		0.1% UF ₆	Արգինինից NH ₃ -ի առաջացում
	4	10	45	50	4.0	6.5	2	9.2	2	4		
LH1	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
LH4	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
LH8	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
LH16	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+
LH21	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
LH24	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
LH34	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
LH35	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
LH38	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
LH42	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
LH43	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
LH44	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Ինչպես երևում է Աղ. 4-ի ներկայացված տվյալներից, 4⁰C-ում չեն աճում 6 կոկային շտամ, 10⁰C-ում երկու, 45⁰C-ում աճում են բոլորը, բացի 4-ից, իսկ 50⁰C աճում են միայն երեքը: Բոլոր լակտոկոկային շտամները, բացի մեկից կայուն են 4% NaCl – ի նկատմամբ, pH 2-ում աճում են բոլորը բացի մեկից, իսկ pH 9.2-ում աճում են բոլորը բացի 2 շտամից, 2% և 4% լեդիով կաթում աճում են բոլորը կոկերը, 6.5% NaCl պարունակող միջավայրում չեն աճում միայն 2 շտամ: 0.1% մեթիլ են կապույտ պարունակող կաթում աճում են 7 լակտոկոկեր, արգինինից ամոնիակ չեն առաջացնում 3 շտամ: Ուսումնասիրվել է նաև տասը տարբեր շաքարների յուրացումը լակտոկոկերի կողմից (Աղ. 5):

Աղյուսակ 5. Լակտոկոկերի ածխաջրերի յուրացման պոտֆիլը

ԿԹԸ	Ռաֆինոզ	Լակտոզ	Տրեզալոզ	Սորբիտ	Ալաբիտոզ	Գալակտոզ	Մալտոզ	Մելբիոզ	Մելիտոզ	Ռիբոզ
LH1	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+
LH4	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+
LH8	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
LH16	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
LH21	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-
LH24	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-
LH34	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
LH35	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
LH38	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+
LH42	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+
LH43	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+
LH44	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-

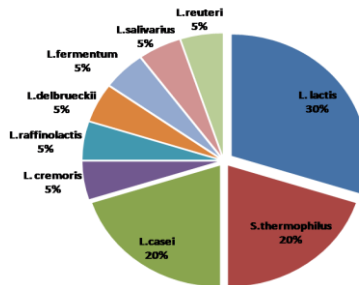
Աղյուսակներ 4 և 5-ում ներկայացված տվյալները վերլուծության հիման վրա անջատված լակտոկոկերը նույնականացվել են ըստ Բերջիի բակտերիաների որոշիչի (Աղ. 6):

Աղյուսակ 6. Լակտոկոկերի նույնականացումը

Տեսակ	Շտամները	Քանակը
<i>L. lactis</i>	LH1, LH4, LH8, LH21, LH38, LH42	6
<i>S. thermophilus</i>	LH24, LH35, LH43 LH44	4
<i>L. raffinolactis</i>	LH16	1
<i>L. cremoris</i>	LH34	1

Ինչպես երևում է Աղ. 6 - ից մայրական կաթից անջատված 12 կոկային շտամներից վեցը պատկանում են *Lactococcus lactis*, մյուս չորսը *Streptococcus thermophilus*, մեկ շտամներ *Lactococcus cremoris* և *Lactococcus raffinolactis* տեսակներին:

Նկար 1-ում ներկայացված է հայաստանաբնակ կանանց մայրական կաթի նմուշներում հայտնաբերված ԿԹՔ - ների տոկոսային հարաբերությունը:



Նկար 1. Հայաստանաբնակ կանաց մայրական կաթում ԿԹՔ-ների տոկոսային հարաբերությունը

Մեր կողմից կատարված ուսումնասիրություններին արդյունքում պարզվեց, որ հայաստանաբնակ կանանց կաթում լակտոկոկերի և լակտոբացիլների հարաբերությունը 3 : 2 է: Լակտոկոկերից առավել հաճախ հանդիպում են *L. lactis* ssp. (30%), *S. thermophilus* (20%), այնուհետև հանդիպման հաճախականությամբ ներկայացված են *L. raffinolactis* (5%) և *L. cremoris* (5%) տեսակները: Լակտոբացիլներից առավել հաճախ հանդիպել է *L. casei* ssp. (20%), այնուհետև *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. salivarius* և *L. reuteri* (5%) պատկանող տեսակները:

3.4. Անջատված ԿԹՔ-ների արոբիոտիկ հարկությունների ուսումնասիրությունը

ԿԹՔ - ների հակամարեային ակտիվությունը որոշվել է՝ *Escherichia coli* MDC 5003, *Candida albicans* MDC 8013, *Staphylococcus aureus* MDC 5233 պատածին թեստ մանեների նկատմամբ սկավառակներով

դիֆուզիայի մեթոդով: Թղթե սկավառակները թրջվել են ԿԹՖ - ների գիշերային կուլտուրաների վերեստվածքային հեղուկներով և տեղադրվել թեստ կուլտուրաներով ծածկված ագարի վրա: Մեկ օր ինկուբացիայից հետո չափվել են թեստ շտամների աճի ճնշման գոտիները (Աղ. 7):

Աղյ ու սակ 7. ԿԹՖ-ների հակամանրէային ակտիվութ յ ու նը

Ընտանիք		Թեստ շտամների ճնշման գոտիները, մմ		
		<i>E.coli</i> MDC 5003	<i>S. aureus</i> MDC 5233	<i>C. albicans</i> MDC 8013
Լակտոբացիլներ	<i>L. delbrueckii</i> LH14, <i>L. salivarius</i> LH27, <i>L. casei</i> LH29	9-14	10-12	8-14
	<i>L. fermentum</i> LH15, <i>L. casei</i> LH25, <i>L. casei</i> LH26, <i>L. casei</i> LH28, <i>L. reuteri</i> LH32	14-25	19-22	16-25
Լակտոկոկկեր	<i>L. lactis</i> LH1, <i>L. lactis</i> LH4, <i>S. thermophilus</i> LH24	5-8	6-8	6-8
	<i>L. lactis</i> LH8, <i>L. cremoris</i> LH34, <i>S. thermophilus</i> LH35, <i>L. lactis</i> LH42	9-14	14-16	8-11
	<i>L. raffinolactis</i> LH16, <i>L. lactis</i> LH21, <i>L. lactis</i> LH38, <i>S. thermophilus</i> LH43, <i>S. thermophilus</i> LH44	14-25	15-27	11-20

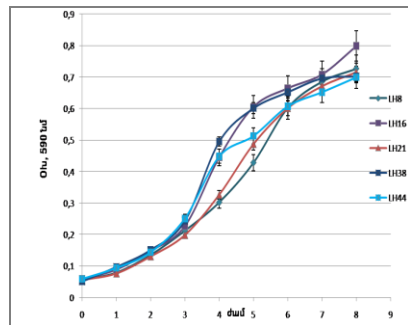
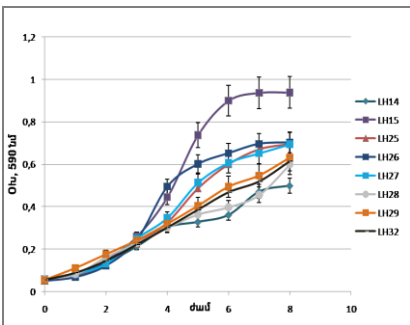
ԿԹՖ-ների մեծ մասն ու նեն արտահայտված հակամանրէային ակտիվութ յ ու ն բոլոր երեք թեստ շտամների նկատմամբ (± 0.5): Լակտոբացիլներից առավել բարձր ակտիվութ յ ամբ օժտված են *L. fermentum* LH15, *L. casei* LH25, *L. casei* LH26, *L. casei* LH28, *L. reuteri* LH32 շտամները, իսկ Լակտոկոկկերից *L. raffinolactis* LH16, *L. lactis* LH21, *L. lactis* LH38, *S. thermophilus* LH43, *S. thermophilus* LH44 շտամները: Պրոբիոտիկների կարևոր հատկանիշներից է նաև կայունութ յ ու նը հակաբիոտիկների հանդեպ, որով որոշվում է նրանց պահպանումը աղեստամոքսային համակարգում երկարատև հակաբիոտիկային թերապիայից հետո: Փորձերը կատարվել է տարբեր հակաբիոտիկների հայտնի խտութ յ ու ններով ներծծված սկավառակներով և պարզվել է, որ ԿԹՖ- ների ճնշող մեծամասնութ յ ու նը հակաբիոտիկներից շատերի հանդեպ ու նեն բարձր կայունութ յ ու ն (± 0.5): Ուսումնասիրութ յ ու նների արդյունքում պարզվել է, որ մայրական կաթից անջատված որոշ ԿԹՖ-ներ օժտված են նաև արտահայտված արոտեոլիտիկ ակտիվութ յ ամբ (± 0.5): Լակտոբացիլների կողմից *E. coli* մանի միջավայրի վրա արոտեոլիդի արդյունքում առաջացրած թափանցիկ գոտիների տրամագիծը կազմել է 22 - 27մմ, մյուսների մոտայն եղել է 11 - 20 մմ: Լակտոկոկկերից առավել ակտիվութ յ ամբ օժտված են *L. lactis* LH4, *L. lactis* LH8, *L. raffinolactis* LH16, *L. cremoris* LH34, *S. thermophilus* LH35, *L. lactis* LH38, *S. thermophilus* LH43, *S. thermophilus* LH44 շտամները, որոնց մոտ թափանցիկ գոտիների տրամագիծը հասնում է 20-23մմ (Աղ. 8):

Աղյուսակ 8. ԿԹԲ-ների պրոտեոլիտիկ ակտիվությամբ

Շտամներ		Թափանցիկ գոտիները, մմ
Լակտոբացիլներ	<i>L. casei</i> LH25	11-20
	<i>L. casei</i> LH26	
	<i>L. salivarius</i> LH27	
	<i>L. delbrueckii</i> LH14	
	<i>L. fermentum</i> LH15	
	<i>L. casei</i> LH28	22-27
	<i>L. casei</i> LH29	
	<i>L. reuteri</i> LH32	
	<i>L. lactis</i> LH1	
	<i>L. lactis</i> LH21	
Լակտոկոկեր	<i>S. thermophilus</i> LH24	14-21
	<i>L. lactis</i> LH42	
	<i>L. lactis</i> LH4	
	<i>L. lactis</i> LH8	
	<i>L. raffinolactis</i> LH16	
	<i>L. cremoris</i> LH34	20-23
	<i>S. thermophilus</i> LH35	
	<i>L. lactis</i> LH38	
	<i>S. thermophilus</i> LH43	
	<i>S. thermophilus</i> LH44	

3.5. ԿԹԲ - ների ածխաջրային և կենսազանգվածի կուտակումը

Կաթնաթթվային բակտերիաների ածխաջրային արագությամբ մարդու էկոհամակարգերի գաղութացման արդյունավետության կարևոր պայմաններից է: Այն հնարավորություն է տալիս օգտակար միկրոօրգանիզմներին առավելության հասնել մրցակից ախտածին միկրոօրգանիզմների հանդեպ հասանելի սննդի արագ յուրացման, կենսատարածքի գրավման և հակամանրէային նյութերի սինթեզի միջոցով: Պրոբիոտիկների ածխաջրային և կենսազանգվածի կուտակումը կարևոր նշանակություն ունի նաև կենսապատաստուկների արտադրության մեջ: Ուսումնասիրվել է մայրական կաթից անջատված ԿԹԲ-ների ածխաջրային օրինաչափությունները MRS միջավայրում, ճոճանակալոր ջրային բաղնիքում, 37°C - ում (Նկ. 2):



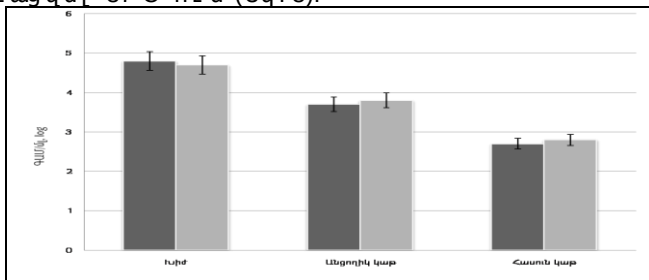
Նկար 2. Լակտոբացիլների և Լակտոկոկերի ածխաջրային և կենսազանգվածի կուտակումը MRS միջավայրում

Նկ. 2-ում ներկայացված կորերից երևում է, որ *L. fermentum* LH15 շտամը տարբերվում է մյուսներից արագ աճով և մեծ կենսազանգվածի կուտակումով: *L. delbrueckii* LH14 շտամը չնայած մեկնարկային արագ աճի ՕԾ 0.5 -ից հետո դադարում է աճել,

հավանական է ջրածնի պերօքսիդի արտադրության պատճառով, որը բերում է ինքնաճման: Մնացած կաթնաթթվային բակտերիաներից, ըստ աճի արագության կարելի է առանձնացնել *L. casei* LH25, *L. casei* LH26 և *L. LH27 salivarius* շտամները: Լակտոկոկերը իրենց աճի արագությամբ էականորեն չեն տարբերվում միմյանցից, սակայն կենսազանգվածի կուտակման մակարդակը *L. raffinolactis* LH16 մոտիմամասաբար բարձր է:

3.6. Մայրական կաթի միկրոբիոմայի քանակական տառանումները Լակտացիայի տարբեր փուլերում

Հետազոտվել է մայրական կաթի ժամանակավոր միկրոբիոմայի քանակական և որակական փոփոխությունները Լակտացիայի տարբեր փուլերում, խիժում, անցողիկ և հասուն կաթի նմուշներում: Կուլտիվացվող բակտերիաների ընդհանուր քանակը որոշվելու համար, մայրական կաթի նմուշի տասնապատիկ նոսրացումները ցանվել են MRS ագարային միջավայրում, ինոկուլացվել ստերիլ կոփի կաթում և ինկուբացվել 37°C-ում (Նկ. 3):



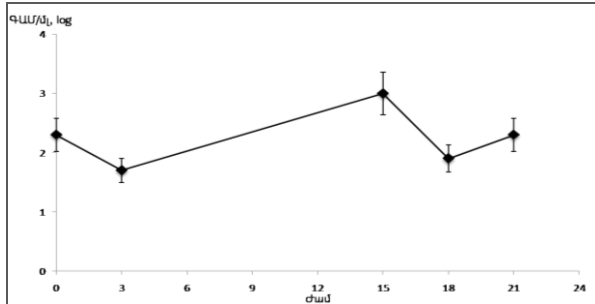
Նկար 3. Խիժի, անցողիկ և հասուն կաթի կուլտիվացվող ԿԹ-ների քանակությունը MRS ագարի վրա (■) և յուղազերծ կոփի կաթում (□)

Մայրական կաթի բակտերիալ տիտրերը որոշվել է MRS ագարի վրա՝ գաղութների քանակով և \$\log\$ մենտացված կաթի փորձանոթների քանակով, որը էականորեն չի տարբերվել միմյանցից: Պարզվել է, որ մայրական կաթում գերակշռող են ԿԹ - ները: Համաձայն ստացված պրոյնուքների խիժում մանրէների տիտրը կազմում է մոտ 10^{4-5} , անցողիկ կաթում 10^{3-4} , իսկ հասուն կաթում 10^{2-3} ԳԱՄ/մլ:

3.7. Մայրական կաթի միկրոբիոմայի քանակական տառանումները կախած կերակրումների միջև ընկած ժամանակահատվածի տևողությունից

Ուսումնասիրվել է կերակրումների միջև ընկած ժամանակահատվածի տևողության ազդեցությունը մայրական կաթի կոմենսալ մանրէների քանակի վրա: Այդ նպատակով Լակտացիայի երկրորդ ամսում գտնվող կնոջը խնդրել ենք 12 ժամ չկերակրել մեկ կրծքով: Առաջին նմուշը վերցրել ենք անմիջապես կերակրելուց առաջ, մյուսը կերակրելուց հետո,

երրորդ նմուշը՝ 12, իսկ չորրորդն 3 ժամ անց: Նմուշներում որոշված բակտերիալ տիտրերը ներկայացված է (նկ.4-ում):

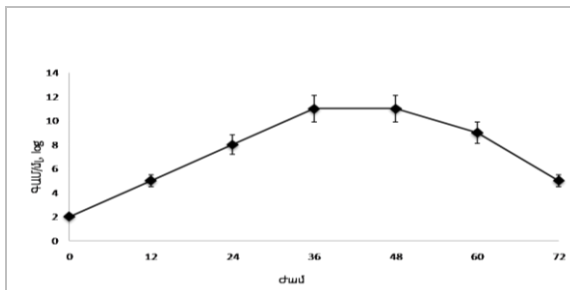


Նկար 4. Մայրական կաթի միկրոօրգանիզմների քանակական փոփոխությունները կրծքում, կախված կերակրումների միջև ընկած ժամանակահատվածից

Սովորաբար կերակրումների միջև տևողությունը կազմում է մոտ երեք ժամ: Մինչև կերակրելը ԿԹԲ-ների քանակը հասուն կաթում կազմում է միջինը 5×10^2 , կերակրելուց հետո այն ընկնում է մոտ 10 անգամ, իսկ 12 ժամյա կերակրման դադարից հետո միկրոօրգանիզմների տիտրը նորից բարձրանում է մինչև 10^3 ԳԱՄ/մլ:

3.8. Մայրական կաթում առկամանրէների աճն *ex vivo*, 37 °C

Թարմ մայրական կաթի նմուշներում որոշվել է առկա կուլ տիվացվող մանրէների քանակը և տեղադրվել է թերմոստատ 37 °C, ստացիոնար պայմաններում: Այնուհետև, 12 ժամ ինտերվալներով երեք օրերի ընթացքում որոշվել է մանրէների քանակը տասնապատիկ նոսրացումների ցանքսով MRS-ազարի վրա և ստերիլ կովի կաթում ինոկուլացման միջոցով (նկ. 5):



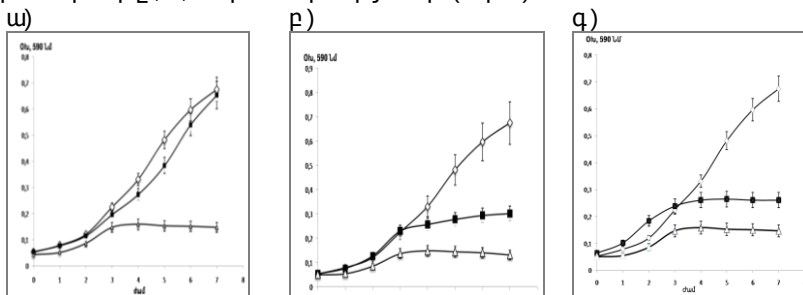
Նկար 5. Մանրէների քանակական փոփոխությունները ex vivo մայրական կաթում, 37 °C- ու մ ինկուբացիայի ընթացքում

Ինչպես երևում է աճման կորերից, կրծքի կաթում մանրէների նախնական քանակը եղել է 2.5×10^2 ԳԱՄ/մլ, ինկուբացիայի հաջորդող 36 ժամերի ընթացքում տեղի է ունեցել բնիկ մանրէների ինտենսիվ աճ, որի արդյունքում նրանց տիտրը հասել է առավելագույնի 3.5×10^{11} ԳԱՄ/մլ: Հետագա,

12 ժամ տևած ստացիոնար փուլից հաջորդող 24 ժամերի ընթացքում մանրէների տիտրը հետզհետե նվազել է մոտ 7 log -ով: Նմանատիպ արդյունքներ ստացվել են կոփի կաթում տիտրացման եղանակով արված փորձերում: Կարևոր է նշել, աճման տարբեր փուլերից վերցված բոլոր նմուշները մերում են կոփի կաթը, այն դեպքում երբ ամբողջ կուլ տիվացման ընթացքում մայրական կաթը չի մակարդվում: *Ex vivo* կուլ տուրաների աճի ուշ լոգարիթմական փուլում սելեկտիվ ազարային միջավայրի վրա արված ցանքսերից աճած գաղութների պատահական եղանակով (ռանդոմ) արված մորֆո-ֆիզիոլոգիական ստուգումների, այնպես էլ կոփի կաթի մակարդման տվյալներից կարելի է եզրակացնել, որ մայրական կաթում առկա սննդի յուրացման մրցակցության ինչպես նաև հակամանրէային միացուցիչ ու ներքին արտադրության արդյունքում ի վերջո մեկ, առավել հազվադեպ երկու, կաթնաթթվային բակտերիաներ դառնում են գերիշխող:

3.9. Լակտուլոզի և բուսական կամեդների յուրացումը ԿԹՔ - ների կողմից

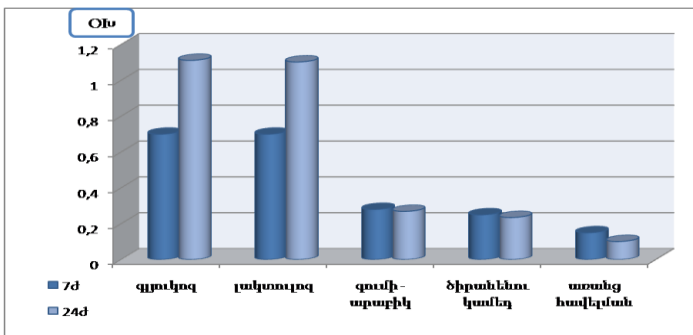
Ադիներում պրոբիոտիկ մանրէների աճը խթանելու նպատակով կիրառվում են սինթետիկ և բնական՝ բուսական ծագում ունեցող օլիգո և բազմաշաքարներ՝ պրոբիոտիկներ: Զայտնի սինթետիկ պրոբիոտիկներից ուսումնասիրվել է լակտուլոզը, իսկ բնականներից՝ ծիրանենու և սենեգալյան ակացիայի (E414) կամեդները: Վերջիններս չեն յուրացվում, սակայն դրական ազդեցություն են թողնում մարդու աղեստամոքսային համակարգի վրա: Նկար 7-ում ներկայացված են *L. fermentum* LH 15 շտամի աճի դինամիկան և կենսաազանգվածի կուտակումը LAPT-M միջավայրում, որտեղ որպես ածխաջրերի միակ աղբյուր օգտագործվել է լակտուլոզը և նշված կամեդները, 1,0% քանակությամբ (Նկ. 6):



Նկար 6. *L.fermentum* LH15 կուլ տուրայի աճի կինետիկան և կենսաազանգվածի կուտակումը լակտուլոզ (ա), սենեգալյան ակացիա (բ), ծիրանենու կամեդ (գ) պարունակող միջավայրում: Ստուգիչ ներքին՝ LAPT-M + գլյուկոզ, Δ- LAPT-M առանց հավելման և ■- LAPT-M հավելումով

Որպես պրոբիոտիկ ստուգիչ հանդիսացել է LAPT-M միջավայրը գլյուկոզով, իսկ նեգատիվ՝ առանց ածխաջրերի: Ինչպես երևում է Նկ. 6-ում ներկայացված կորերից, (ա) *L.*

fermentum LH15 կուլ տուրան և ակտուլ ռզով իր աճի արագության ամբ և կենսազանգվածի կուտակումով չի գիշում գլյուկոզին: Ծիրանենու և գուլմիարաբիկ կամեդներ պարունակող միջավայրերում (բ), գ), կուլ տուրաները կարճ և ազ փուլից հետո անցնում են ռզարիթմիկ աճի փուլ և սկսում ինտենսիվ աճել 3 ժամ: *L. fermentum* LH15 կամեդի դյուրամարս կոմպոնենտների յուրացումից հետո անցնում է ստացիոնար փուլ, որը վկայում է կամեդների կազմի մեջ մտնող դյուրամարս շաքարների և չյուրացվող բազմաշաքարների առկայության մասին: Թափահարիչի վրայոթ ժամյա աճից հետո շտամը տեղափոխվել է թերմոստատ և ինկուբացիան շարունակվել մինչև 24 ժամ և րանալը, այնուհետև չափվել է ՕԽ-ները (Նկ.7)



Նկար 7. ԿԹԲ-ների կենսազանգվածի կուտակումը աճի աճի տարբեր աղբյուրներ պարունակող LAPTМ միջավայրում 24 ժամ ստացիոնար պայմաններում

Ինչպես երևում է Նկար 7-ից, թերմոստատում գլյուկոզ և և ակտուլ ռզ պարունակող միջավայրերում ՕԽ-ները հասել են մինչև 1.2 (± 0.2): Ծիրանենու կամեդ և գուլմիարաբիկ պարունակող միջավայրերում կուլ տուրայի հետագա աճ և կենսազանգվածի կուտակում տեղի չի ունեցել, սակայն ՕԽ-ները մնացել են անփոփոխ: Մինչդեռ ռզարիթմիկ ստուգիչում տեղի է ունեցել ՕԽ-ի կտրուկ անկում:

Այսպիսով, կարելի է եզրակացնել, որ բուսական կամեդները նպաստում են ԿԹԲ-ների կենսունակության երկարատև պահպանմանը, հավանական է նրանց միկրոպատիճավորման միջոցով:

ԵԶՐԱԿԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

1. Հայաստանի առողջ կանանց կրծքի կաթում գլխավորապես տարածված են և ակտիվ կերպով և ակտիվացիլները մոտավորապես 3 : 2 հարաբերությամբ:
2. ԿԹԲ-ների քանակը խիժում կազմում է 10^{4-5} , անցողիկ կաթում 10^{3-4} , իսկ հասուն կաթում 10^{2-3} ԳԱՄ/մլ:

3. Կրծքի կաթից անջատված կաթնաթթվային լակտոբացիլները արագ, իսկ լակտոկոկերը համեմատաբար դանդաղ մերում են կովի կաթը, սակայն չեն մերում մայրական կաթն, որը պայմանավորված է վերջինիս կազեինների ոչ բավարար քանակով և բարձր pH-ով:
4. Կախված երեխայի կերակրելու պարբերություններից կրծքի կաթում ԿԹԲ-ների քանակը տատանվում է: 12 ժամ չկերակրված կրծքում նրանց քանակը մոտ 10 անգամ ավելի է 3-4 ժամ պարբերությամբ կերակրված կրծքի համեմատ:
5. Առաջին անգամ, *ex vivo* փորձերում ցույց է տրվել, որ ինտակտ կրծքի կաթում առկա միկրոօրգանիզմները 37°C-ում, անաերոբ պայմանում ազատ բազմանում, մեկ երկու օրում հասնում են մինչև 10^{10-11} ԳԱՄ/մլ. Կրծքի կաթում *ex vivo* աճի վերջում գերիշխող է դառնում մետաբոլիկ և հակաբակտերիալ բարձրակտիվությամբ օժտված ԿԹԲ-ների մեկ, հազվադեպ երկու տեսակ: Դրանով կարելի է բացատրել երեխայի աղիներում ԿԹԲ-ների սահմանափակ տեսակային բազմազանությունը:
6. Մայրական կաթից անջատված ԿԹԲ-ները սինթետիկ պրեբիոտիկ լակտուլոզի յուրաքանչյուր անգամի խթանման արդյունավետությամբ չեն զիջում գլյուկոզին:
7. Բուսական բնական արտազատուկներից հայկական ծիրանենու և ակացիայի կամեդների 15 - 20% է յուրացվում ԿԹԲ-ների կողմից: Այն դեպքում երբ նրանց չյուրացվող բաղադրիչները՝ գլյուկոռանան և արաբիտոզալ ակտանը ընդունակ են պաշտպանել բջիջները ընդհանուր առմամբ մաններից և սթրեսներից:

Առեւտրային հիմնական արդյունքները տպագրված են հետևյալ աշխատանքներում

1. **Danielyan L. V.,** Hovhannisyan H. G. The Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria from Breast Milk // 2nd International Scientific Conference of Young Researchers: “Contribution of the Young Generation in the Development of Biotechnology”. Book of Abstracts, Yerevan, 2013, p. 55.
2. **Danielyan L.V.,** Hovhannisyan H.G. Some features of *Lactococcii* isolated from human breast milk // International Scientific Workshop: “Trends in Microbiology and Microbial Biotechnology”. Book of Abstracts, Yerevan, 2014, p.50.
3. **Danielyan L.V.,** Hovhannisyan H.G. A strain of *Lactobacillus fermentum* LH-15 isolated from human breast milk // III International Scientific Conference of Young Researchers: “Dialogues on Science”. Book of Abstracts, Yerevan, 2015, p. 23.
4. **Danielyan L.V.,** Hovhannisyan H.G. The study of lactic acid bacteria isolated from human breast milk in Armenia // Biological Journal of Armenia, Special Issue, 2016, p. 13-18.

5. **Դանիելյան Լ.Վ.** Մայրակալան կաթից անջատված կաթնաթթվային բակտերիաների բնութագիրը // Հայաստանի բժշկագիտության ՀԱՊԱ Մեդիցինական Գիտություններ, Զ. LVI, №3, 2016, էջ 50-56.
6. Hovhannisyan H.G., **Danielyan L.V.** Human Milk's Microbial Population Behavior *In Vivo and Ex Vivo* // International Journal of Health Sciences and Research. Vol.7; Issue: 9; 2017, p. 249-254.
7. **Danielyan L.V.**, Hovhannisyan H.G. The study of commensal microbes propagation in human milk // IV International Scientific Conference of Young Researchers: "Biotechnology: Science and Practice". Book of Abstracts, Yerevan, 2017, p. 22-23.
8. **Даниелян Л.В.**, Чичоян Н.Б., Оганесян Г.Г. Усвоение лактулозы и различных растительных камедей молочнокислыми бактериями, выделенными из грудного молока // Медицинская наука Армении НАН РА, т. LVII, №3, 2017 p. 59-66.
9. **Դանիելյան Լ.Վ.** Հոմոֆանոսիայի մայրակալան կաթի կաթնաթթվային բակտերիաների պրոբիոտիկ հատկությունները // ՀՀ ԳԱԱ գեղակույցներ, Հատոր 117, №3, 2017, էջ 265-272.

ДАНИЕЛЯН ЛУСИНЕ ВАЗГЕНОВНА

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ ИЗ МАТЕРИНСКОГО МОЛОКА

РЕЗЮМЕ

Ключевые слова: микрофлора материнского молока, фенотипическая и молекулярная идентификация, пробиотики, *in vivo* и *ex vivo*, пребиотики, растительные камеди.

Впервые изучена микрофлора молока здоровых армянских женщин. Из молока 23-х женщин-добровольцев, с соблюдением всех правил асептики и стерильности, были взяты пробы и в течение одного часа доставлены в лабораторию. Сразу из десятикратных разведений грудного молока были сделаны засевы в растопленные (46 °C) селективные (MRS) и полноценные агаризованные среды методом заливки в чашки. Кроме этого были сделаны разведения в стерильном обезжиренном коровьем молоке. Титр микроорганизмов, который подсчитывался по количеству колоний, выросших на агаризованных средах, и количеству разведений, ферментировавших молоко, оказался примерно одинаковым, что свидетельствовало о принадлежности микроорганизмов грудного молока к кокковидным или палочковидным представителям отряда *Lactobacillales*. Титр бактерий в молозиве составил 10^{4-5} , в переходном молоке 10^{3-4} , а в зрелом 10^{2-3} КОЕ/мл. Случайным методом отобранные колонии ферментировали коровье молоко и состояли из грамположительных кокковидных или палочковидных бактерий в соотношении 3: 2, соответственно.

Выделенные чистые культуры 8-и лактобацилл и 12-и лактококков были фенотипически идентифицированы согласно «Определителю бактерий Берги». Оказалось, что микрофлора грудного молока армянских женщин состоит из *Lactococcus lactis* ssp. (30%), *Streptococcus thermophilus* (20%), *Lactococcus raffinolactis* (5%),

Lactococcus cremoris (5%), *Lactobacillus casei* ssp. (20%), *Lactobacillus delbrueckii* (5%), *Lactobacillus fermentum* (5%), *Lactobacillus salivarius* (5%) и *Lactobacillus reuteri* (5%). Проведенная фенотипическая идентификация выделенных штаммов была подтверждена RAPD PCR молекулярным тестированием фрагментов ДНК.

Изучение пробиотических свойств выделенных из материнского молока штаммов МКБ показало, что их подавляющее большинство обладает высокой антибактериальной и антигрибковой активностью. МКБ, которые эффективно сквашивали коровье молоко, обладали высокой протеолитической активностью. Наличие таких штаммов в детском кишечнике будет способствовать лучшему усвоению белков, особенно при подкармливании детскими смесями, приготовленными на основе коровьего молока. Проведенные эксперименты показали, что МКБ, обитающие в материнском молоке, обладают высокой скоростью роста и накоплением биомассы, что дает им определенные преимущества для успешной колонизации кишечника младенца. Была показана высокая устойчивость МКБ к различным антибиотикам, что является залогом их выживания при применении антибиотической терапии как у ребенка, так и у матери в период беременности и грудного кормления.

Была изучена изменчивость популяции резидентных микроорганизмов в зрелом грудном молоке *in vivo* в зависимости от длительности перерывов между кормлениями. Было установлено, что при обычных 3-4 часовых перерывах перед кормлением титр клеток составляет в среднем 10^3 КОЕ/мл, сразу после кормления титр падает на один лог, затем до следующего кормления восстанавливается. При 12-часовом воздержании от кормления титр клеток может достигнуть 10^4 КОЕ/мл, но не более. Интересная динамика изменения популяции резидентных микроорганизмов была обнаружена в опытах по определению роста выделенных культур на грудном молоке вне организма (*ex vivo*). Нами впервые в *ex vivo* экспериментах было показано, что при инкубации интактного молока при 37°C происходит бурный рост микроорганизмов и в течение 24 часов титр достигает до 10^{11} КОЕ/мл, при этом все разведения до одиннадцатого свертывали коровье молоко, образуя густые сгустки. Это свидетельствует о том, конечная популяция культуры материнского молока состоит главным образом из молочнокислых бактерий. Даже при наличии такого громадного титра молочнокислых бактерий материнское молоко не свертывается - заметны бывают только небольшие белые хлопья. В дальнейших экспериментах было установлено, что после роста в материнском молоке популяция клеток состоит из одного, в редких случаях двух видов МКБ, которые в силу высокой удельной скорости роста и выработки антибактериальных веществ подавляют рост остальных микроорганизмов и становятся доминантными видами.

С целью создания пероральных синбиотических препаратов, состоящих из пробиотических бактерий, выделенных из грудного молока, и пребиотиков, стимулирующих их рост, предназначенных для улучшения грудной микрофлоры беременных женщин, нами в качестве пребиотиков был опробован ряд синтетических и растительных олиго- и полисахаридов - лактулоза, камедь армянского абрикосового дерева и гуммиарабик сенегальской акации (Е414). Были проведены эксперименты по изучению усвоения 1.0 %-ных растворов вышеуказанных полимеров в качестве единственного источника углеводов. В качестве позитивного контроля служила LАРТМ с глюкозой, а негативного - питательная среда без источников углеводов. Было показано, что МКБ, выделенные из грудного молока по скорости роста и накоплению биомассы на среде с лактулозой не уступает позитивному контролю. Однако в средах с камедью абрикосового дерева и гуммиарабиком бактерии в первые

три часа росли со скоростью наравне с глюкозой, потом рост резко замедлялся из-за истощения доступных источников углеводов, составляющих 15-20 % общей массы. В случае длительной инкубации культур, в контрольной среде без углеводов наблюдалось резкое падение оптической плотности вследствие лизиса клеток, тогда как в присутствии неусвояемых компонентов растительных полисахаридов ОП оставалась неизменной. Вероятнее всего, указанные растительные полимеры консервируют бактериальные клетки путем их микрокапсулирования.

DANIELYAN LUSINE V.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PROBIOTICS FROM BREAST MILK

SUMMARY

Key words: human milk microbiome, phenotypic and molecular identification, probiotics, *in vivo* and *ex vivo* study, prebiotics, plant gums.

The milk microflora of healthy Armenian women was studied for the first time. From the breast milk of 23 women volunteers observing all the rules of asepsis and sterility, samples were taken and within one hour delivered to the laboratory. Immediately tenfold dilutions were inoculated into the melted (46°C) selective MRS and nutrition agars by the cup pouring method. Besides, there were dilutions in sterile skimmed cow milk. The titer of microorganisms, determined by the number of colonies formed in the agar media and the number of dilutions fermenting milk, was approximately the same indicating belonging of breast milk microorganisms to the coccoid or rod-shaped representatives of the *Lactobacillales* order. The titer of bacteria in colostrum was 10^{4-5} , in transitional milk 10^{3-4} , and in mature milk 10^{2-3} CFU/ml. Randomly selected colonies fermented cow milk and consisted of gram-positive coccoid or rod-shaped bacteria in a ratio of 3: 2.

The isolated 8 lactobacilli and 12 lactococci pure cultures were phenotypically identified according to the Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The microflora of breast milk of Armenian women consisted of *Lactococcus lactis* ssp. (30%), *Streptococcus thermophilus* (20%), *Lactococcus raffinolactis* (5%), *Lactococcus cremoris* (5%), *Lactobacillus casei* ssp. (20%), *Lactobacillus delbrueckii* (5%), *Lactobacillus fermentum* (5%), *Lactobacillus salivarius* (5%) and *Lactobacillus reuteri* (5%). The phenotypic identification of isolated strains was confirmed by RAPD PCR molecular testing of their DNA fragments.

The study of the probiotic properties of strains isolated from mother's milk showed that their majority possessed high antibacterial and antifungal activity. LAB, which effectively fermented cow milk, had also high proteolytic activity. The presence of such strains in the infant's intestine will contribute to better assimilation of proteins, especially when fed with infant formulas prepared on the basis of cow milk. Experiments have shown that LAB that live in human milk have high growth rate and biomass accumulation, which give them certain advantages for successful colonization of the baby's intestine. High resistance of LAB to various antibiotics was shown, which is important for their survival in

case of antibiotic therapy in both the baby and the mother during pregnancy and breastfeeding.

The variability of the resident microorganisms population in mature breast milk was studied *in vivo*, depending on the duration of the breaks between feedings. It was found that with usual 3-4 hour breaks before feeding, the cell titer averages 10^3 CFU/ml; immediately after feeding, the titer drops by one log, then it is restored until the next feeding. With 12-hour abstinence from feeding the titre of cells can reach 10^4 CFU / ml, but no more. Interesting dynamics of the change in the population of resident microorganisms was found in breast milk outside the body. We showed for the first time in *ex vivo* experiments that when the intact milk was incubated at 37°C , a rapid growth of microorganisms took place and within 24 hours the titer reached 10^{11} CFU/ml. At the same time, all dilutions up to the eleventh curdled cow milk forming thick curds. This shows that the final population of the mother's milk culture consists mainly of lactic acid bacteria. Even with such a huge titer of LAB, mother's milk does not curdle - only small white flakes are noticeable. In subsequent experiments it was found that after growth in human milk, the population of cells consists of one, in rare cases two species of LAB, which, due to high specific growth rate and production of antibacterial substances, inhibit the growth of other microorganisms and become the predominant species.

In order to create oral synbiotic preparations consisting of probiotic bacteria isolated from breast milk and prebiotics stimulating their growth designed to improve pregnant women's breast milk microflora, we tested a number of synthetic and plant oligo- and polysaccharides as prebiotics – lactulose, a gum of Armenian apricot tree and gum Arabic of Senegalese acacia (E414). Experiments were conducted to study the assimilation of 1.0% solutions of these polymers as the sole source of carbohydrates. As a positive control served LPTM with glucose, and as negative – nutrient medium without sources of carbohydrates. It was shown that the LAB isolated from breast milk in a medium with lactulose by the rate of growth and accumulation of biomass are not inferior to a positive control. However, in media with gum of apricot tree and gum arabic, bacteria in the first three hours grew at the same rate as glucose, then the growth was sharply slowed due to the exhaustion of available sources of carbohydrates, amounting to 15-20% of the total mass of the gums. In the case of prolonged incubation of the cultures, in the control medium without carbohydrates, there was a sharp drop in optical density (OD) due to cell lysis, whereas in the presence of indigestible components of plant polysaccharides, the OD remained unchanged. Most likely, these plant polymers preserve bacterial cells by microencapsulation.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'M. Kuznetsov' or similar, written in a cursive style.