

ՀՀ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
«ՀԱՅԿԵՆՍԱՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱ» ԳԱԿ ՊՈԱԿ

ԴԱՆԻԵԼ ՅԱՆԼՈՒՄԻՆԵ ՎԱԶԳԵՆԻ

ՄԱՅՐԱԿԱՆ ԿԱԹՅ ՊՐՈԲՆՈՏԻԿ ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ԱՆՋԱՏՈՒ ՄԸ
ԵՎ ԲՆՈՒԹԱԳՐՈՒ ՄԸ

ԱՏԵՆԱԿՈՍՈՒԹՅՈՒՆ

Գ.00.07- «Միկրոբիոլոգիա. կենսատեխնոլոգիա» մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի գիտական
աստիճանի համար

Գիտական ղեկավար՝

Կ.Գ.Պ., պրոֆեսոր Յ.Գ. Հովհաննիսյան

ԵՐԵՎԱՆ 2017

ԲՈՎԱՆԴԱԿՈՒԹՅՈՒՆ

ՆԵՐԱՃՈՒԹՅՈՒՆ	6
ԳԼՈՒԽ 1. ԳՐԱԿԱՆ ԱԿՆԱՐԿ	12
1.1. Կաթնաթթվային բակտերիաների ընդհանուր բնութագիրը	12
1.2. Կաթնաթթվային բակտերիաները և մարդու առողջությանը ...	14
1.2.1. Մարդու նորմոֆլորան	14
1.2.2. Աղիքային միկրոֆլորան	14
1.3. Պրոբիոտիկ մանրէներ	16
1.4. Մայրական կաթի բաղադրությունը	19
1.4.1. Մայրական կաթի կենսաակտիվ գործոնները	22
1.4.2. Մայրական կաթի միկրոբիոմային բազմազանությունը	22
1.4.3. Մայրական կաթի միկրոբիոմային առաջացման աղբյուրը	25
1.5. Բնական և մայրական կաթի պրոբիոտիկների դերն աղիներում մորախնայ պրոբիոտիկ շտամների աճի խթանիչներ	28
ԳԼՈՒԽ 2. ՆՅՈՒԹԵՐ ԵՎ ՄԵԹՈԴՆԵՐ	30
2.1. Սննդային միջավայրեր, լուծույթներ և ռեակտիվներ	30
2.2. Մանրէային կուլտուրաներ	30
2.3. Մայրական կաթի նմուշառումը	30
2.4. Մայրական կաթի կուլտիվացվող մանրէների քանակության որոշումը	31
2.5. Մայրական կաթից մանրէների մաքուր կուլտուրաների անջատումը	31
2.6. Գրամով ներկումը և մանրադիտակային հետազոտությունը	33
2.7. ԿթՔ-ների կայունության որոշումը NaCl-ի նկատմամբ	33
2.8. ԿթՔ-ների կայունության որոշումը լեզու նկատմամբ	33
2.9. Տաքեր pH-ի նկատմամբ կայունության որոշումը	33
2.10. ԿթՔ-ների կայունության որոշումը 0.1 % մեթիլեն կապույտի նկատմամբ	33

2.11. ԿԹԲ-ներին կողմից արգիսիսից ամոնիակի առաջացման որոշումը	34
2.12. ԿԹԲ-ներին ջերմակայ ունույթն ունեցող որոշումը	34
2.13. ԿԹԲ-ներին կողմից ածխաջրերի յուրացման որոշումը	34
2.14. ԿԹԲ-ներին կաթի մակարդման արագույն որոշումը	35
2.15. Պոտենցիոմետրիկ և տիտրացվող թթվային որոշումը	35
2.16. ԿԹԲ-ներին կատալազային ակտիվության որոշումը	35
2.17. ԿԹԲ-ներին ածխաբույսի արագույն որոշումը	35
2.18. Լակտոբացիլների RAPD ՊՇՌ-ն ու նախնականացումը	35
2.19. ԿԹԲ-ներին հակամանրէային ակտիվության որոշումը	36
2.20. Պրոտեոլիտիկ ակտիվության որոշումը	36
2.21. Հակաբիոտիկների նկատմամբ զգային որոշումը	36
2.22. Մայրական կաթում մանրէների քանակական փոփոխությունների որոշումը կախված կերակրման ժամանակահատվածից <i>in vivo</i>	37
2.23. Մայրական կաթի ռեզիդենտ մանրէների ածխաբույսի որոշումը <i>ex vivo</i>	37
2.24. Պրոբիոտիկների ազդեցությունը ԿԹԲ-ներին ածխաբույսի վրա	37
2.25. ԿԹԲ-ներին երկարատև պահպանումը	37
2.26. Ստացված տվյալների վիճակագրական մշակումը	38
ԳԼՈՒԽ 3. ՓՈՐՁԱՐԱՐԱԿԱՆ ՄԱՍ	38
3.1. ԿԹԲ-ներին մաքուր կուլտուրաների ստացումը	38
3.2. Լակտոբացիլների մորֆոմետրիկ և տեխնոլոգիական հատկությունները	39
3.2.1. Լակտոբացիլների օքսիդազային, կատալազային ակտիվությունները և արգիսիսից ամոնիակի առաջացման ուսումնասիրությունը, Գրամով ներկումը	41
3.2.2. Լակտոբացիլների ֆիզիոլոգիական և կուլտուրալ հատկությունները	41

3.2.3. Լակտոբացիլների կաթի մակարդման արագությունը և մակարդուկների տիրացվող թթվայնությունը	41
3.2.4. Լակտոբացիլների ածխաջրերի յուրացման պրոֆիլը	42
3.2.5. Անջատված Լակտոբացիլների մետաբոլիկ հատկությունների վերլուծությունը և նույնականացումն ըստԲերջիի բակտերիաների որոշիչի	43
3.2.6. Լակտոբացիլների նույնականացումը RAPD ՊՇՌ-ի միջոցով ..	46
3.3. Մայրական կաթից մեկուսացված Լակտոկոկերի ուսումնասիրությունը	45
3.3.1. Լակտոկոկերի մորֆոմետրիկ և տեխնոլոգիական հատկությունները	45
3.3.2. Լակտոկոկերի ֆիզիոլոգիական և կուլտուրալ հատկությունները	47
3.3.3. Լակտոկոկերի կատալազային, օքսիդազային ակտիվությունները, արգինինից ամոնիակի առաջացումը և Գրամով ներկումը	48
3.3.4. Լակտոկոկերի կաթի մակարդման արագությունը և մակարդուկների տիրացվող թթվայնությունը	50
3.3.5. Լակտոկոկերի ածխաջրերի յուրացման պրոֆիլը	51
3.3.6. Լակտոկոկերի աճը էքստրեմալ ջերմաստիճաններում	52
3.3.7. Անջատված Լակտոկոկերի մետաբոլիկ հատկությունների վերլուծությունը և նույնականացումն ըստԲերջիի բակտերիաների որոշիչի	53
3.4. Անջատված շտամների պրոբիոտիկ հատկությունները	53
3.4.1. Լակտոբացիլների հակամանրէային ակտիվությունը	53
3.4.2. Լակտոբացիլների պրոտեոլիտիկ հատկությունները	54
3.4.3. Լակտոբացիլների կայունությունը հակաբիոտիկների հանդեպ.....	55
3.4.4. Լակտոկոկերի հակամանրէային ակտիվությունը	57
3.4.5. Լակտոկոկերի պրոտեոլիտիկ ակտիվությունը	58

3.4.6. Լակտոկոկերի կայունությունը հակաբիոտիկների հանդեպ.	59
3.5. Լակտոբացիլների և Լակտոկոկերի աճի կինետիկան, կենսազանգվածի կուտակումը	60
3.6. Մայրական կաթի միկրոբիոմայի քանակական տատանումները Լակտացիայի տարբեր փուլներում	62
3.7. Մայրական կաթում կուլտիվացվող մանրէների վարքագիծը <i>in vivo</i> ու սուսումնասիրություններում	63
3.8. Մայրական կաթի բնիկ մանրէների աճը <i>ex vivo</i> , 37 °C	64
3.9. Սինթետիկ օլիգոշաքարների և բուսական կամեդների յուրացումը Լակտոբակտերիաների կողմից	66
3.9.1. Լակտուլոզի յուրացումը <i>L. fermentum</i> LH15 շտամի կողմից	66
3.9.2. Գումիարաբիկի (սենեգալյան ակացիայի արտազատուկի) յուրացումը <i>L. fermentum</i> LH15 շտամի կողմից	68
3.9.3. Ծիրանենու կամեդի յուրացումը <i>L. fermentum</i> LH15 շտամի կողմից	69
ԱՄՓՈՓՈԼՄ	72
ԵԶՐԱԿԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ	80
ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅԱՆ ՑԱՆԿ	81
ՀԱՎԵԼՎԱԾ 1	101
ՀԱՎԵԼՎԱԾ 2	102
ՀԱՊԱՎՈՒՄՆԵՐԻ ՑԱՆԿ	103

ՆԵՐԱՃՈՒ ԹՅՈՒՆ

Ինդրի արդիականությունը

Կաթնաթթվային բակտերիաները լայնորեն տարածված են մարդու աղեստամոքսային և միզասեռական համակարգերում, ինչպես նաև վերջին հետազոտությունների արդյունքներով՝ մայրական կաթում:

Աղիքային միկրոֆլորան կարևոր դեր է խաղում մարդու հումորալ իմունիտետի բարձրացման և հարուցիչների դեմ պայքարի գործում: Համաձայն մինչև վերջերս գոյություն ունեցող կարծիքի, աղիքային միկրոֆլորան ձևավորվում է ինքնաբերական սննդակարգի, աշխարհագրական, կլիմայական և այլ գործոնների ազդեցության տակ, սկսած մարդու կյանքի առաջին օրերից մինչև հասուն տարիք [27, 30, 31, 40, 56, 57, 61, 77, 86, 89, 104, 145, 147]: Սակայն, ինչպես ցույց տվեցին վերջին հետազոտությունները աղիքային միկրոֆլորայի ձևավորման գործում առաջնային դեր են խաղում մայրական կաթում հայտնաբերված օգտակար մանրէները: Նախկինում մայրական կաթը համարվում էր մանրէազերծ, սակայն վերջին հետազոտությունները ցույց տվեցին, որ աղիքային միկրոֆլորայի կազմավորման գործում առաջնային դեր է խաղում մայրական կաթում գոյություն ունեցող ժամանակավոր միկրոֆլորան, որը սկսում է ձևավորվել հղիության երրորդ եռամսյակում և վերջանում լակտացիայի ավարտին [8, 15, 58, 60]: Առաջին մի քանի ամիսներին մայրական կաթը համարվում է նորածինների աճի և զարգացման համար լիարժեք սնունդ, որը պաշտպանում է օրգանիզմը տարբեր ինֆեկցիաներից, ալերգիաներից և ասթմայից: Այդ ազդեցությունը կարող է պայմանավորված լինել այն հանգամանքով, որ մայրական կաթը հանդիսանում է որպես փոխադրամիջոց՝ իմունային բջիջների, օգտակար պրոբիոտիկ մանրէների, օլիգոշաքարների, բիֆիդոգեն գործոնների և բազմաթիվ այլ օգտակար միացությունների համար, որոնք նպաստում են նորածնի բնական միկրոֆլորայի ձևավորմանը: Կրծքի կաթի միկրոֆլորայի կազմը կախված է ժառանգականությունից, ինչպես նաև մոր սննդակարգից, օգտագործվող դեղորայքից,

սոցիալական ու բնակլիմայական պայմաններից, աշխարհագրական դիրքից և այլն: Աշխարհի տարբեր երկրներում հետազոտություններ են տարվում մայրական կաթի միկրոֆլորայի բազմազանության ու սուլմնասիրության ուղղությամբ [15, 17, 43, 44, 50, 57, 58, 78, 81, 102, 108, 119, 123, 127, 152, 160]:

Հայաստանաբնակ կերակրող կանանց մոտ այդպիսի հետազոտություններ մինչև այժմ չեն իրագործվել, որը շատ կարևոր է հղիության շրջանում կրծքում ձևավորվող միկրոբիոտայի վրա ազդելու և հետագայում նորածինների աղետամոքսային համակարգի միկրոֆլորայի ձևավորման գիտաարկտիկ հայեցակարգի մշակման համար:

Հետազոտության նպատակը և խնդիրները

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

Խնդիրներն են՝

1. Հայաստանաբնակ կանանց մայրական կաթի նմուշներից կաթնաթվային բակտերիաների մաքուր կուլտուրաների անջատումը:
2. Անջատված ԿԹԲ-ների մորֆո-ֆիզիոլոգիական, կուլտուրալ, մետաբոլիկ հատկությունների ուսումնասիրումը և նույնականացումը ըստԲերջիի բակտերիաների որոշիչի:
3. Ընտրված շտամների մոլեկուլային գենետիկական նույնականացումը RAPD ՊՇՌ մեթոդով և ավանդադրումը:
4. Անջատված ԿԹԲ-ների հակամանրեային հատկությունների և հակաբիոտիկների հանդեպկայունության ուսումնասիրումը:
5. Հեռանկարային ԿԹԲ-ների պրոտեոլիտիկ ակտիվության, աճման և կաթի մակարդման արագության որոշումը:
6. Մայրական կաթի ռեզիդենտմիկրոֆլորայի պահվածքի ուսումնասիրությունը.

- կրծքում *in vivo*, կախված լակտացիայի փուլերից և կերակրման ցիկլից
- կովի կաթում *in vitro*
- մայրական կաթում *ex vivo*

7. Սինթետիկներ ստեղծելու նպատակով սինթետիկ և բնական պրոբիոտիկների ազդեցության ուսումնասիրությունը անջատված ԿԹԲ-ների աճի և կենսունակության պահպանման վրա:

Աշխատանքի գիտական նորոգյալ

Հաստատվել է հայաստանաբնակ առողջ կանանց կրծքի կաթում պրոբիոտիկ միկրոօրգանիզմների բարձր քանակությունների $\sim 10^5$ ԳԱՄ/մլ առկայությունը: Կրծքի կաթից անջատված միկրոօրգանիզմների մեծամասնությունը համաձայն ֆենոգենետիկական նույնականացման ըստ Բերջիի բակտերիաների որոշիչի և RAPD ՊՇՌ տվյալների իրենից ներկայացնում է լակտոկոկեր և 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 կաթում կաթնաթվային բակտերիաները հանդես են գալիս որպես գերակշռող տեսակներ: Առաջին անգամ ցույց է տրվել, որ կրծքի կաթում առկա կաթնաթվային բակտերիաները, ի տարբերություն կովի կաթի, չեն մակարդում մայրական կաթը, այն դեպքում երբ *ex vivo* պայմաններում ինտենսիվ բազմանում են գոյացնելով 10^{11} ԳԱՄ/մլ մեկ երբեմն երկու տեսակներից կազմված պոպուլյացիա: Սինթետիկ կենսապատրաստուկներ ստեղծելու նպատակով ուսումնասիրվել է լակտուլոզի և բուսական ծագման կամեդների ազդեցությունը մայրական կաթից մեկուսացված լակտոբացիլների աճի վրա: Առաջին անգամ ցույց է տրվել գումիարաբիկում և ծիրանենու կամեդում մանրէների կողմից յուրացվող (15~20%) և մանրէային բջիջները կոնսերվացնող ֆրակցիաների առկայությունը:

Աշխատանքի կիրառական նշանակությունը

Առավել բարձր պրոբիոտիկ և տեխնոլոգիական հատկություններով
օժտված կաթնաթթվային բակտերիաների կուլտուրաներ պարունակող
կենսաապատրաստուկները կարելի է օգտագործել հղիության երրորդ
եռամսյակում կանանց կրծքագեղձերի գաղութացման համար:
Ընտրված շտամները՝ բնական և արհեստական պրոբիոտիկների հետ
միաժամանակ, կարելի է կիրառել մանկական սննդում աղիների
կենսագործունեության բարելավման և օգտակար միկրոֆլորայի
պահպանման նպատակով: Պրոտեոլիտիկ բարձր ակտիվությամբ օժտված
շտամների օգտագործումը մանկական կաթնային խառնուրդներում
կնպաստի կազեինների յուրացմանը և կնվազեցնի նրանց բացասական
ազդեցությունն երեխայի աղեստամոքսային համակարգի
գործունեության վրա:

Պարտականության ներկայացվող դրույթները

1. Հայաստանաբնակ կանանց կրծքի կաթից կաթնաթթվային
բակտերիաների մաքուր կուլտուրաների անջատումը, նրանց
մորֆո-ֆիզիոլոգիական, կուլտուրալ և մետաբոլիկ
հատկությունները:
2. Մայրական կաթի մանրէաբանական կազմի վարքագիծը *in vivo* և *ex vivo*
պայմաններում:
3. Անջատված շտամների դասակարգումն ըստ Բերջիի
բակտերիաների որոշիչի և մոլեկուլային գենետիկական
տվյալների:
4. Անջատված շտամների հակամանրէային և պրոտեոլիտիկ
հատկությունները:
5. Ընտրված շտամների կողմից որպես ածխածնի աղբյուր
սինթետիկ և բնական պրոբիոտիկների յուրացումը:

Աշխատանքի կատարողի անձնական ծրագրերի թեմաների հետ

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

Յեղիսակի անձնական ներդրումը

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

Աշխատանքի քննարկումը և հրապարակումները

Ատենախոսության արդյունքները զեկուցվել 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 4nd 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:

Ատենախոսության հիմնադրույթները և բովանդակությունը ներկայացված են հրատարակված 9 գիտական աշխատություններում, որոնցից 5 հոդված, այդ թվում 1 հոդված առանց համահեղինակների, 4 թեզիս՝ տպագրված միջազգային գիտաժողովների ժողովածուներում:

Աշխատանքի կատարման վայրը

Աշխատանքը կատարվել է ՀՀ ԳԱԱ «Հայ կենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի կաթնաթթվային բակտերիաների և շաքարասնկերի, այժմ՝ սննդի կենսաանվտանգության և աբորատորիայում, իսկ մոլեկուլային գենատիպավորումը Ստանդարտ դիալոգ ընկերությունում:

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:

ԳԼՈՒԽ 1. ԳՐԱԿԱՆ ԱԿՆԱՐԿ

1.1. Կաթնաթթվային բակտերիաների ընդհանուր բնութագիրը

Կաթնաթթվային բակտերիաները լայնորեն տարածված են մարդու և կենդանիների օրգանիզմներում և համարվում են սպեցիֆիկ խմբի միկրոօրգանիզմներ, որոնք խմորում են ածխաջրերը առաջացնելով կաթնաթթու [4, 7, 10, 16, 29, 32, 61, 67, 90, 101]: Բնության մեջ կաթնաթթվային բակտերիաները ներկայացված են կոկային և ձողային ձևերով: Կոկային կաթնաթթվային բակտերիաները, դրանք կաթնաթթվային ստրեպտոկոկեր են և պատկանում են *Streptococcaceae* ընտանիքին: Ներկայացված են 3 ցեղերով՝ *Lactococcus* (*Lac.*), *Leuconostoc* (*Leu.*), և *Streptococcus* (*Str.*), 7 տեսակներով և 4 ենթատեսակներով (Աղ. 1) [100]:

Աղյուսակ 1

Կաթնաթթվային բակտերիաների դասակարգումը [Bergey, 2009]

Դասակարգում	Լակտոբացիլներ	Լակտոկոկեր
Տիպ	Firmicutes	Firmicutes
Դաս	Bacilli	Bacilli
Կարգ	Lactobacillales	Lactobacillales

Ընտանիք	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Streptococcaceae</i>
Ցեղ	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactococcus</i>

ԿԹԲ-ները գրամդրական էուբակտերիաներ են, որոնք պատկանում են *Lactobacillaceae* ընտանիքին, ներկայացված են շուրջ 150 տեսակներով, չափսերը տատանվում են $(0.5 - 1.0) \times (1.5 - 8.0)$ մկմ սահմաններում: Լակտոբացիլները էվոլյուցիայի ընթացքում կորցրել են իրենց գենոմի մոտ 25% -ը, որի պատճառով իրենց աճի և կենսագործունեության համար կարիք ունեն պատրաստի սննդանյութերով հարուստ՝ ամինոթթուներ, վիտամիններ, ածխաջրեր, ճարպաթթուների եթերներ, որոշ աղեր և նույլ եինաթթվի ածանցյալներ պարունակող միջավայրերի, ինչպիսիք են կաթը, բուսական հումքը և այլն [48, 100]:

Բոլոր ԿԹԲ-ները գրամդրական միկրոաէրոֆիլ միկրոօրգանիզմներ են, գերակշիռ մասը մեզոֆիլ են, աճի օպտիմալ ջերմաստիճանը տատանվում է 25°C-40°C միջև, նվազագույնն կարող է հասնել 5°C-ի, իսկ առավելագույնը 50 °C-ի, օպտիմալ pH-ը՝ 5.5 – 5.8 սահմաններում է: Կաթնաթթվային բակտերիաները իրենց աճի և կենսագործունեության համար օգտագործում են ածխաջրեր, որոնց խմորման արդյունքում առաջացնում են էներգիա կաթնաթթու [100]:

Ըստ նյութափոխանակության ձևի ԿԹԲ-ները լինում են հոմոֆերմենտատիվ, երբ գլյուկոզի խմորման արդյունքում առաջանում է կաթնաթթու և հետերոֆերմենտատիվ, երբ խմորման արդյունքում բացի կաթնաթթվից առաջանում է էթանոլ / ացետատ և ածխածնի երկօքսիդ [28, 100]:

Կաթնաթթվային բակտերիաների հակամանրեային ակտիվությունը պայմանավորված է իրենց կենսագործունեության արգասիքներով՝ կաթնաթթվով, որն իջեցնում է միջավայրի pH-ը, ինչպես նաև ջրածնի պերօքսիդով, բակտերիոցիններով և այլ միացություններով: Նման հատկությունների շնորհիվ կաթնաթթվային բակտերիաները համարվում են պրոբիոտիկներ և լայնորեն կիրառվում են բժշկության մեջ տարբեր

հիվանդությունների՝ հատկապես աղեստամոքսային խանգարումների կանխագել ման և բուժման նպատակով [28, 48, 85]:

1.2. Կաթնաթթվային բակտերիաները և մարդու առողջությունը

1.2.1. Մարդու նորմոֆլորան

Մարդու նորմոֆլորան (էոլբիոզ), բաղկացած է ինչպես մշտական (ռեզիդենտ) այնպես էլ ժամանակավոր (տրանզիտոր) միկրոօրգանիզմներից, որոնք գտնվելով որակական և քանակական փոխադրեցության մեջ, պահպանում են օրգանիզմի կենսաքիմիական, նյութափոխանակային և իմունային հավասարակշռությունը: Միկրոբիոցենոզի կարևորագույն գործառույթը համարվում է օրգանիզմի պաշտպանությունը զանազան ախտածին միկրոօրգանիզմներից, տարբեր օրգանների (մաշկ, բերանի խոռոչ, քիթ-ըմպան, աղեստամոքսային համակարգ, հեշտոց, կրծքագեղձ) գաղութացման միջոցով [62, 132, 151, 155]:

Մարդու նորմոֆլորան հիմնականում ներկայացված է հետևյալ տեսակներին՝ պատկանող մանրէներով՝ *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Peptococcus*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Candida*, *Acetovibrio*, *Corynebacterium*, *Neissera*, *Rothia*, *Microccus*, *Haemophilus*, *Veillonella*, *Mobiluncus*, *Propionibacterium*, *Arachnia*, *Selenomonas*, *Escherichia*, *Simonsiella*, *Gemmiger* և այլն [175]:

1.2.2. Աղիքային միկրոֆլորան

Մարդու աղիքային նորմոֆլորան ձևավորվում է դեռևս կյանքի առաջին ժամերից՝ ծննդաբերական ուղիների, մայրական կաթի և շրջակա միջավայրի միկրոօրգանիզմներով: Երեք ամսական հասակում երեխայի մոտ արդեն առկա է չափափառ բնորոշ ձևավորված աղիքային միկրոֆլորա՝ կազմված տարբեր տեսակների պատկանող անաերոբ մանրէներից, որոնց քանակը կարող է հասնել մինչև 10^{14-15} [110, 112, 141]: Բնիկ (ռեզիդենտ) միկրոօրգանիզմները աղիների գաղութացման միջոցով պահպանում են նորմոֆլորայի

որակական և քանակական կազմը: Այստեղ ներառված են 450 - 500 տեսակներին պատկանող մանրէներ, որոնց ընդհանուր քաշը կարող է հասնել մոտ 1.2 կգ:

Աղիքային էկոհամակարգը համագործակցում է օրգանիզմի հետ և ապահովում է նրա պաշտպանությունը տարբեր վարակներից: Աղիների ինքնամաքման և ինքնավազման գործառույթները կատարվում են ինքնուրույն, որով պահպանում են հոմեոստազի կայուն ներդաշնակությունը: Այս պրոցեսների խախտման դեպքում նշանակվում են պրոբիոտիկներ, որոնք խթանում են աղիների բնական գործընթացները: Պրոբիոտիկները կարող են աճել, ժամանակավոր կամ մշտական գոյատևել աղիներում՝ գաղութացնելով և բարձրացնելով կայունությունը ախտածին միկրոօրգանիզմների նկատմամբ [1, 84, 115, 116, 118, 124, 170]:

Այս գործառույթները ապահովում են նորմոֆլորայի կայունության ձևավորումը և կանխում վնասակար մանրէներով աղիների գաղութացումը: Առողջ մարդկանց աղիներում առավել հաճախ հանդիպող տեսակները ներկայացված են (Աղ. 2.):

Աղյուսակ 2.

Աղեստամոքսային համակարգի նորմոֆլորան [Gibson G.R, 1999]

Մանրէների տեսակները	ԳԱՄ/գ կղանքում
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	10^8 - 10^{10}
<i>Lactobacillus</i>	10^6 - 10^9
<i>Bacteroides</i>	10^7 - 10^9
<i>Peptacoccus & Peptostreptococcus</i>	10^5 - 10^6
<i>Enterococcus faecalis</i>	10^5 - 10^7
<i>Escherichia coli</i>	10^6 - 10^8
<i>Staphylococcus aureus</i>	10^4 - 10^5
<i>Enterobacter sp.</i>	10^9 - 10^{10}

<i>Clostridium perfringens</i>	$10^3 - 10^5$
--------------------------------	---------------

Աղիքային միկրոֆլորայի գործառույթները

- Մորֆոկենետիկ և էներգետիկ ազդեցություն (էպիթելի էներգաշրջանառություն և աղիների պերիստալտիկա)
- Աղիների լորձաթաղանթի պաշտպանիչ պատնեշի ձևավորում, պաթոգեն միկրոֆլորայի ճնշում
- Վիտամինների սինթեզ
- Իմունային համակարգի խթանում (իմունոգլոբուլինների արտադրություն)
- Ցիտոխրոմների գործառույթների մոդուլյացիա
- Էկզոգեն և էնդոգեն տոքսիկ նյութերի հակաթունավորում
- Կենսաբանական ակտիվ միացությունների արտադրություն
- Մուտագեն և հակամուտագեն ակտիվություն
- Աղիների գազափոխանակություն
- Ջրա-աղային փոխանակության կարգավորում և իոնային հոմեոստազի պահպանում
- Սիմբիոտիկ փոխազդեցություն պրոկարիոտ և էուկարիոտ բջիջների միջև
- Նյութափոխանակային պրոցեսների մասնակցություն (սպիտակուցների, ածխաջրերի, ճարպերի, լեղաթթուների):

1.3. Պրոբիոտիկ մանրէներ

Պրոբիոտիկների պատմությունը սկսվել է մարդկային պատմության հետմիասին: Դեռևս հին ճոռաստանում և ճոռում շատ էին օգտագործում ֆերմենտացված սննդամթերք: «Պրոբիոտիկ» տերմինը սկսվել է օգտագործվել 1965 թ.-ից Լիլլի և Ստիլոելի կողմից և առաջացել է հունարեն *pro* և *bios* բառերի համակցությունից, որն թարգմանաբար նշանակում է «կյանքի համար»: Յետագայում Պարկերի կողմից 1974 թ.-ին «պրոբիոտիկ»-ը բնորոշվել է որպես նյութ, որը կարգավորում է մարդու

մարսողական համակարգի հավասարակշռությունը: Պրոբիոտիկները որպես կողմնակի ազդեցություններից զուրկ նյութեր երկար տարիներ օգտագործվում են որպես սննդային հավելումներ [33, 83]: Համաձայն Միավորված Ազգերի սննդի, գյուղատնտեսության և առողջապահության համաշխարհային կազմակերպության՝ պրոբիոտիկները սահմանում են որպես «կենդանի միկրոօրգանիզմներ, որոնք համապատասխան քանակությամբ օգտագործելիս շահեկան ազդեցություն են թողնում առողջության վրա»:

1908թ. ռուս գիտնական Ի. Մեչնիկովը, առաջինն էր, որ առաջարկեց պրոբիոտիկները օգտագործել որպես օրգանիզմի վրա դրական ազդեցություն ունեցող միկրոօրգանիզմներ: Նա հավատացած էր, որ բուլղարների առողջության և երկարակեցության գաղտնիքը օգտագործվող կաթնամթերքներն են [102]:

Պրոբիոտիկների ազդեցությունը մարդու առողջության վրա կարելի է դիտարկել հետևյալ հատկանիշներով [13, 49, 82, 144].

- Բարձրացնում են օրգանիզմի իմունային համակարգը
- Կանխում են հաստաղու և կրծքագեղձի քաղցկեղը
- Ճնշում են ախտածին միկրոօրգանիզմների աճը (հակաբակտերիալ հատկություն)
- Նվազեցնում են խլեպտերինի և եռգլիցերիդների տոկոսը արյան պլազմայում
- Իջեցնում են արյան ճնշումը
- Նվազեցնում են ալերգիկ հիվանդությունները
- Դրական են ազդում միկրոէլեմենտների փոխանակությանը, հիմնականում Ca-ի (կանխում են օստեոպորոզը)
- Իջեցնում են *Helicobacter pylori* -ով վարակվելու հավանականությունը

Մարսողական համակարգի նորմալ միկրոֆլորան սերտկապի մեջ լինելով էպիթելային և իմունային բջիջների հետ, խթանում է իմունային համակարգը [23, 26, 72, 73, 76]:

Կլիսիկական հետազոտությունների արդյունքում հաստատվել է, որ պրոբիոտիկ մանրէները կարող են բարձրացնել օրգանիզմի բնական և ձեռք բերված իմունային ռեակցիան [67, 68]: Օրինակ, առողջ մեծահասակ մարդկանց մոտ պրոբիոտիկ մանրէների կոնկրետ շտամների օգտագործման դեպքում դիտվում է նաև սպեցիֆիկ իմունիտետի բարձրացում, ինչպես նաև ծայրամասային արյան մեջ լեյկոցիտների ֆագոցիտար հատկության արտահայտվածություն [67, 122, 156]: Մեխանիզմը, որով պրոբիոտիկ մանրէները կարողանում են բարձրացնել հումորալ իմունիտետը դեռևս պարզ չէ [97]: Ենթադրվում է, որ պրոբիոտիկ միկրոօրգանիզմները ադիեզիայի են ենթարկվում ոչ միայն էպիթելյալ, այլև իմունային բջիջների վրա, որոնց քանակը ադիներում, ինչպես հայտնի է, կազմում է նրանց ընդհանուր քանակի ավելի քան 70%-ը: Իմունային բջիջների վրա ադիեզիան ապահովում է պրոբիոտիկ մանրէների փոխադրումը ներկաթնային անցուղիով դեպի մայրական կաթնագեղձեր:

Պրոբիոտիկ բակտերիաների նկատմամբ նախատեսված հիմնական չափորոշիչները ներկայացված է Աղ. 3-ում [49]:

Աղյուսակ 3

Պրոբիոտիկների հիմնական չափորոշիչները [Dunne C., 2001]

Պրոբիոտիկ շտամների առաջադրվող պահանջները	Նշանակությունը
Մարդկային ծագումը	Կյանքի որակի բարելավումը
Կայունությունը լեղու և թթվի նկատմամբ	Պերօրալ ընդունման ժամանակ ապահովում է աղեստամոքսային համակարգի խոչընդոտների հաղթահարումը:

Ինքնաագրեգացիան , համաագրեգացիան և ադիեգիան լործաթաղանթի և էպիթելյալ բջիջների մակերեսին	Ադիեգիան , հակաբակտերիալ պաթոգեն միկրոօրգանիզմների ճնշումը , ադիների գաղութացումը և իմունիտետի բարձրացումը :
Սննդում և դեղամիջոցներում օգտագործման համար անվտանգության երաշխիք	Շտամների ճշգրիտ բնութագրումը , նույնականացումը և կողմնակի ազդեցության նվազագույն մակարդակը :
Կլինիկական փորձարկումների փաստագրված տվյալների առկայություն	Ազդեցության անհրաժեշտ նվազագույն ցուցումների հասանելիություն յուրաքանչյուրի համար :
Բարձր տեխնոլոգիական հատկություններ	Արագ բազմացումը և կենսունակության պահպանումը , գենետիկական ստաբիլությունը , ֆագերի և թթվի նկատմամբ կայունությունը :

1.4. Մայրական կաթի բաղադրությունը

Ամիսներ շարունակ մայրական կաթը համարվում է նորածինների աճի և զարգացման համար միակ իարժեք սնունդ, որը պաշտպանում է օրգանիզմը տարբեր ինֆեկցիաներից, ալերգիաներից և աղիքային խանգարումներից :

Մայրական կաթն իրենից ներկայացնում է բարդ կենսաբանական հեղուկ, որը պարունակում է նորածինների աճին անհրաժեշտ միկրոէլեմենտներ, սպիտակուցներ, ճարպեր, ածխաջրեր, ճարպալույծ վիտամիններ (A, E, K), հանքային էլեմենտներ՝ երկաթ, նատրիում, ֆոսֆոր, ցինկ, նաև A դասի իմունոգլոբուլիններ, հորմոններ, ֆերմենտներ, իմուն և աճի գործոններ, ինչպես նաև պրոբիոտիկ մանրէներ (Աղ.4) [5, 11, 23, 35, 104, 105, 130, 142, 143, 162] :

Աղյուսակ 4

Մայրական հասուն կաթի բաղադրությունը [Kulski J.K,1981]

100մլ մայրական կաթի չոր գանգվածի կազմը - 11.9%	
Ճարպեր 3.9%	Ֆոսֆոլիպիդները, չհագեցած ճարպաթթուներ, խոլեստերին
Սպիտակուցներ 1%	Շիճուկային սպիտակուցներ, տաուրին, լակտոֆերին, կազեին
Ածխաջրեր 6.8%	Լակտոզ, օլիգոզաքարներ
Միկրոէլեմենտներ 0.2%	Ca, Fe, Mg, P, K, Na, Zn
Հորմոններ և ածի գործոններ	Էպիդերմալ ածի գործոններ, Էրիթրոպոետին, թիրոքսին, թիրեոտրոպին-ռելիզինգ, պրոլակտին, խոլոցիստոկինին, պրոստոգլանդիններ
Ֆերմենտներ	Լիզոցիմ, լակտոֆերին, լիպազ, ամիլազ, պրոտեազ, քսանօքսիդազ
Իմուն գործոններ	Ֆագոցիտներ, Tև B Լիմֆոցիտներ, իմունոգլոբուլիններ

Մայրական կաթը յուրահատուկ է նաև իր բաղադրության մեջ գտնվող բազմազան օլիգոզաքարների բարձր կոնցենտրացիայով [21, 38, 42, 64]: Թեև հետազոտողների մեծ մասի հետաքրքրությունները կենտրոնացած են պրեբիոտիկ օլիգոզաքարների ֆերմենտացման և բիֆիդոգենոլոգիայի վրա, *in vitro* որոշ ուսումնասիրություններ ցույց են տվել, որ այդ միացությունները հաճախ նմանակում են էուկարիոտ բջիջների մակերեսի ռեցեպտորներին, որոնցից կառչում են ախտածին բակտերիաները որպես ախտածնության գործընթացի բաղադրիչ: Օրինակ, ցույց է տրվել գալակտոօլիգոզաքարների (ԳՕԾ) կողմից պաթոգեն *Escherichia coli* ադիզիայի կանխարգելումը HEP-2 և Caco-2 բջիջների վրա, որն ավելի արդյունավետ է եղել ինուլինի և ֆրուկտոօլիգոզաքարների (ՖՕԾ) համեմատ [157]:

Մայրական կաթը պարունակում է մոտավորապես 7% ածխաջրեր, որոնց 90% -ը լակտոզն է և լակտոզի հիման վրա տարբեր

օլիգոշաքարներ: Օլիգոշաքարները (ՕՇ) մարդու կաթի երրորդ խոշորագույն բաղադրիչն են հանդիսանում, որի ավելի բարձր քանակություներն հայտնաբերված է խիժում, որտեղ այդ նյութերը կազմում են ընդհանուր ածխաջրերի մոտ 24% -ը [11, 42, 64, 92, 95]: Այս նյութերի կոնցենտրացիաները կրծքի կաթում դանդաղորեն նվազում են ծնվելուց հետո առաջին երկու ամսվա ընթացքում 19% -ից մինչև 15%: ՕՇ-ը կրծքի կաթում կարող են հասնել 8 - 12 գ/լ –ի ինչը 100 անգամ ավելի է, քան կովի կաթում: Մայրական կաթի մեջ ՕՇ-ների հիմնական շաքարային բաղադրիչներն են սիալաթթուներ, N-ացետիլ գլյուկոզամինը, L-ֆրուկտոզը, d-գլյուկոզը և d-գալակտոզը: Որոնք հանգեցնում են ավելի քան 130 տարբեր օլիգոշաքարների բարդ խառնուրդի, քանի որ հնարավոր է տարբեր շաքարների համադրությունների մեծ բազմազանություն: ՕՇ-ների տեսակային կազմի վրա ուղակի ազդեցություն ունի նաև մոր արյան խումբը [99, 104, 168, 171, 172, 177]:

Կաթնաթթվային բակտերիաների և բիֆիդոբակտերիաների աճը նորածնի աղիներում խթանում են ոչ միայն մայրական կաթում գտնվող օլիգոշաքարները, այլև նուկլեոտիդները, որոշ սպիտակուցներ, ինչպես նաև կենսաբանորեն ակտիվ պեպտիդները [51, 71, 171]:

Մայրական կաթը իր բաղադրության շնորհիվ անփոխարինելի է նորածինների աճի և զարգացման համար: Ի տարբերություն ստանդարտացված արհեստական մանկական կաթնային խառնուրդների, մայրական կաթի բաղադրությունը դինամիկ է և փոփոխվում է կերակրումների հաճախականության, օրվա ժամերի, լակտացիայի փուլերի, մայրերի սննդակարգի, հակաբիոտիկների օգտագործման հետևյալն [27, 30, 63, 166, 176]:

Կրծքի կաթը, որը սկսում է գոյանալ հղիության վերջին եռամսյակում և շարունակվում է ծննդաբերությունից 5 - 10 օրերի ընթացքում իրենից ներկայացնում է խիժ, որը տարբերվում է հասուն կաթից ինչպես ծավալով, արտաքին տեսքով, այնպես էլ բաղադրությամբ:

Այն պարունակում է ավելի շատ քանակի իմունոգլոբուլիններ IgA, IgG, լակտոֆերին, լեյկոցիտներ և աճման գործոններ, որի

շնորհիվ այն առավելապես է ազդում մանկան իմունիտետի բարձրացման վրա: Արդեն կերակրման երկրորդ շաբաթում անցողիկ մայրական կաթը դառնում է միջին հասունության, իսկ 4-6 շաբաթանոց կաթը համարվում է հասուն, որի բաղադրությունը ներկայացված է Աղ.4-ում [104, 109, 111]:

Կարևոր է նշել, որ բացի սննդային արժեքներից, մայրական կաթի բաղադրության մեջ հայտնաբերված են նաև որոշ կենսաակտիվ գործոններ, որոնք մշակվում և փորձարկվում են բժշկության մեջ որպես պրոֆիլակտիկ և թերապևտիկ միջոցներ:

1.4.1. Մայրական կաթի կենսաակտիվ գործոնները

Մայրական կաթը իրենից ներկայացնում է համալիր խառնուրդ, որը մատակարարում է ոչ միայն սնունդ և էներգիա երեխայի աճի և զարգացման համար, այլև գործոններ, որոնք աջակցում են օրգանիզմի միկրոկենսաբանական պաշտպանությանը [2, 3, 5, 53, 89, 91, 136]:

Մայրական կաթի բաղադրության մեջ մտնում են տարբեր կենսաակտիվ գործոններ՝ իմունոգլոբուլիններ, լիզոցիմ, հակամանրէային միացություններ, օլիգոշաքարներ, գլիկոպրոտեիններ, օրինակ՝ լակտոֆերին, պոլիամիններ, իմունային բջիջներ և կենսաակտիվ պեպտիդներ, որոնք ունեն հակաբորբոքային ազդեցություն [86, 154]: Մայրական կաթի այս կենսաակտիվ միացությունները կարևոր դեր են խաղում հակաբորբոքային համակարգի կարգավորման գործընթացում: Շնորհիվ մայրական կաթի իմունոխթանիչ հատկության, կրճքով կերակրվող նորածինները ինֆեկցիոն հիվանդություններով՝ կարմրախտ, պոլիոմիելիտ և դիֆթերիայով չեն հիվանդանում, ինչպես նաև հիվանդանալու դեպքում սրությունը անհամեմատ փոքր է, քան այն երեխաների մոտ, որոնք սնվում են արհեստական կաթնային խառնուրդներով [8, 9, 12, 18, 34, 35, 79, 128]:

1.4.2. Մայրական կաթի միկրոբիոմային բազմազանությունը

Միայն վերջերս է հայտնի դարձել, որ մայրական կաթը համարվում է սինոտրոպ, մուտոլիտիկ և պոտենցիալ պրոբիոտիկ

միկրոօրգանիզմների աղբյուր: Միկրոօրգանիզմների առկայությունը մայրական կաթում նորածինների աղիքային նորմալ միկրոֆլորայի ձևավորման հիմնական պայմանն են:

21-րդ դարի սկզբին, երկու եվրոպական հետազոտական խմբեր, միմյանցից անկախ, մայրական կաթից անջատել և ուսումնասիրել են պրոբիոտիկ ներուժ ունեցող կաթնաթթվային բակտերիաներ [115, 116]: Նրանք իրենց աշխատության ունենրում նշում են, որ մայրական կաթի մանրէները պաշտպանում են ինչպես մորը, այնպես էլ նորածինն ինֆեկցիաներից, որոնց առաջացման հիմնական պատճառը *Staphylococcus aureus* ախտածին բակտերիան է [22]: Մարտինը իր աշխատության ունենրում նկարագրում է իրենց կողմից միջարք կաթնաթթվային բակտերիաների մեկուսացումը և նույնականացումը, մասնավորապես *L. gasseri* CECT 571423, *L. salivarius* CECT 571324 և *L. fermentum* CECT 571623 [108, 118, 119], որոնք իրենց պրոբիոտիկ հատկություններով չեն զիջում շատ առևտրայնացվող շտամներին՝ մեկուսացված աղիքային համակարգից [140, 107, 108, 113]:

Մայրական կաթի ուսումնասիրությունները հարյուրավոր կանանց մոտ հայտնաբերել է բազմաթիվ պրոբիոտիկներ՝ բիֆիդոբակտերիաներ, լակտոբակտերիաներ [7, 8, 14, 15, 50, 60, 81, 114, 115], որոնց տեսակային բազմազանությունը մայրական կաթում փոփոխվում է տարբեր երկրների, քաղաքների և գյուղական համայնքների միջև [27, 30, 31]:

Գրականության տվյալների հիման վրա մեր կողմից ընդհանրացվել է տարբեր երկրներում մայրական կաթից անջատված մանրէների բազմազանության և տարածվածության վերաբերյալ տվյալները, որը համակարգ ձևով ներկայացված է աղյուսակ 5-ում:

Աղյուսակ 5

Մայրական կաթի միկրոֆլորայի բազմազանությունը աշխարհում

Երկիր	Առավել շատ հանդիպող տեսակներ
Իսպանիա	<i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus gasseri</i> , <i>Lactobacillus salivarius</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Bifidobacterium breve</i>
Շվեդիա	<i>Lactobacillus reuteri</i>
Թուրքիա	<i>Lactobacillus oris</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i>
Եգիպտոս	<i>Lactobacillus salivarius</i>

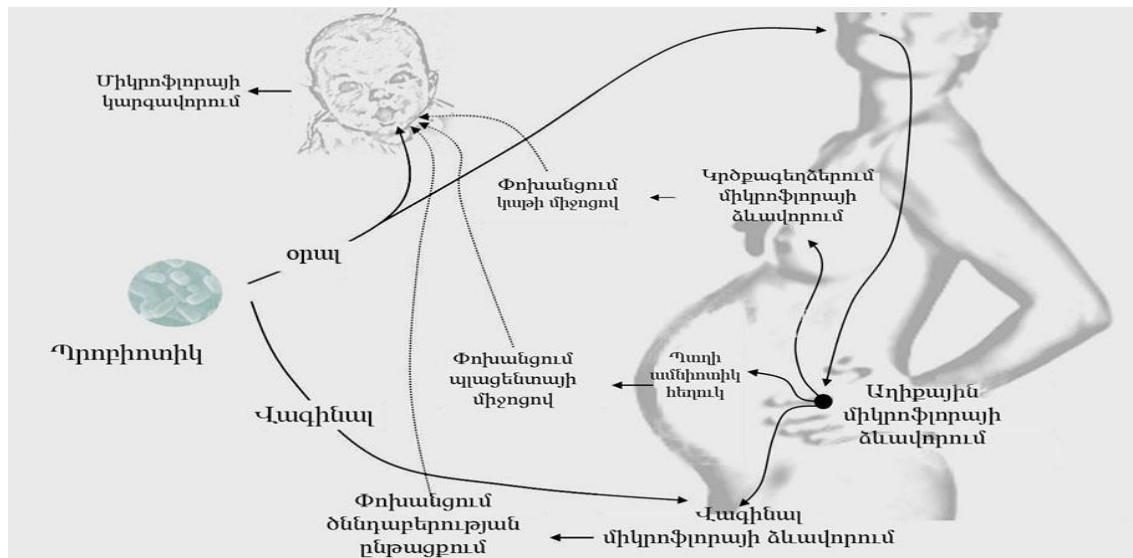
Սառւ դիան Արաբիա	<i>Lactococcus lactis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i>
Ֆինլանդիա	<i>Lactococcus lactis</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i>
Իրան	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus reuteri</i>
Մալագիա	<i>Lactobacillus salivarius</i>
Չնդկաստան	<i>Lactococcus lactis</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus reuteri</i> , <i>Lactobacillus oris</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i>
Եթովպիա	<i>Lactobacillus gasseri</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Enterococcus faecium</i>
Լյուքսեմբուրգ	<i>Bifidobacterium</i> , <i>veillonella spp.</i>
ԱՄՆ	<i>Lactobacillus crispatus</i> , <i>Lactobacillus gasseri</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus gasseri</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>
Ինդոնեզիա	<i>Lactobacillus rhamonusus</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i>
Նորվեգիա	<i>Lactobacillus fermentum</i>
Բանգլադեշ	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus</i>
Մեքսիկա	<i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus</i>

Լակտոբացիլներից ավելի հաճախ հանդիպող տեսակներից են՝ *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus fermentum* և *Lactobacillus salivarius*, իսկ լակտոկոկերից՝ *Lactococcus lactis*-ը, որոնց պրոբիոտիկ հատկությունները համազոր են շատ առևտրայնացվող շտամների հետ [81, 106, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 160]:

Մայրական կաթում մանրէները գտնվում են որոշակի հավասարակշռված վիճակում, որոնց ընդհանուր քանակը հասնում է մինչև 10^4 ԳԱՄ/մլ [120, 139]: Մանրէների այս քանակությունը վնասակար չէ կրծքագեղձի էպիթելի համար, սակայն բավարար է նորածինների աղիների արդյունավետ գաղութացման համար: Նորածինը օրական միջին հաշվով օգտագործում է 800մլ կաթ՝ կլանելով միջինը 10^6 մանրէ [81]: Այն փաստը, որ առողջ կանանց կրծքի կաթից անջատված բակտերիաները մեկուսացվել են տարբեր երկրներում, վկայում է նրանց տարածվածության մասին: Հետևաբար դրանք պետք է դիտարկել որպես մայրական կաթի և կաթնագեղձերի բնականոն միկրոբիոտա, այլ ոչ թե աղտոտվածություն:

1.4.3. Մայրական կաթի միկրոբիոմայի առաջացման աղբյուրը

Տարբեր գիտահետազոտական խմբերի հետազոտությունների արդյունքում առաջ է քաշվել աղիներից դեպի կուրծք մանրէների ներթափանցման մեխանիզմ, ըստ որի հղիության վերջին եռամսյակում մոր աղիքային միկրոբիոմայից դրանք կաթնագոյացման անցուղիով (enteromammary route) անցնում են կրծքագեղձեր և ձևավորում «ժամանակավոր» միկրոֆլորա, որը վերանում է կաթնարտադրության ավարտի հետ (Նկ. 1):



Նկար 1. Մայրական կաթում մանրէների առաջացման հավանական մեխանիզմը [Rodríguez J. M.]

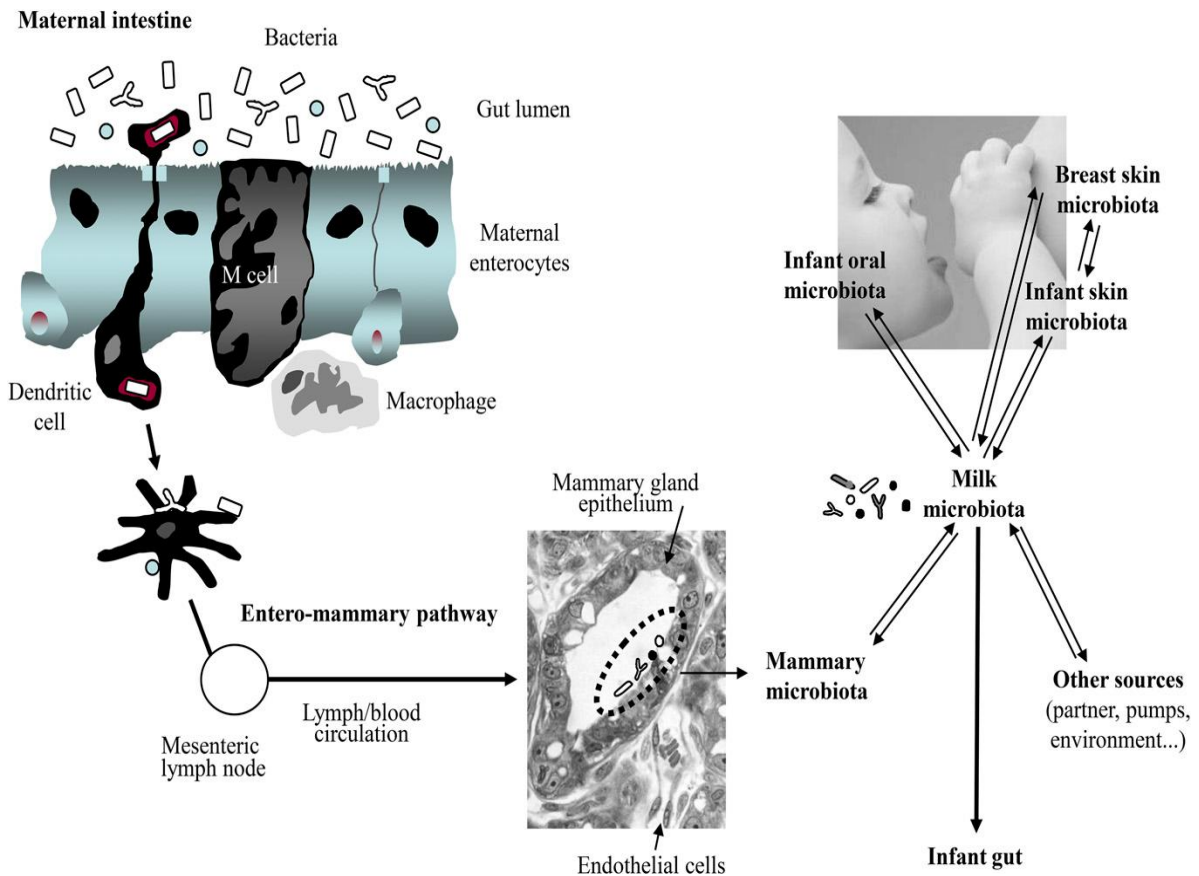
Կան ենթադրություններ, որ որոշ օգտակար մանրէներ, հատկապես բիֆիդոբակտերիաները, երեխային կարող են անցնել հեշտոցային ճանապարհով ծննդաբերության ժամանակ: Բնական ճանապարհով և կեսարյան հատումով ծննդաբերած կանանց կրծքի կաթում հայտնաբերվել են տարբեր միկրոբային համադրություններ, որոնք հաստատում են, որ միկրոբները նորածիններին են անցնում են նաև բնական ճանապարհով՝ ծննդաբերության ժամանակ [30, 52, 86, 87, 93, 118, 149]: Հերքվել է կրծքի մաշկի միջոցով աղտոտվածության անցման վարկածը, օրինակ՝ բիֆիդոբակտերիաները լինելով խիստ անաերոբ միկրոօրգանիզմներ չեն կարող գոյատևել մաշկի վրա աներոբ պայմաններում:

Հնարավոր է նաև, որ կերակրման ընթացքում նորածինների բերանի խոռոչից որոշ մանրէներ, հիմնականում ստրեպտոկոկեր,

որոնք համարվում են բերանի խոռոչի գերակայ ողջ, հետադարձ ուղիով անցնեն կրծքագեղձ և աղտոտեն մայրական կաթը: Սակայն այս վարկածը նույնպես հերքվել է, քանի որ հղիության վերջին եռամսյակում ծննդաբերությունից առաջ արտադրվող խիժից և ծննդաբերությունից հետո մայրական կաթից անջատվել են նույն մանրէները [74, 114, 115, 116, 134, 148, 149, 160]:

Վերջին ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ որոշ մանրէներ կարող են կաթնագեղձեր մուտք գործել մայրական աղեստամոքսային համակարգից: Մինչ այդ արդեն հայտնի էր, որ մանրէների որոշ տեսակներ ընդունակ են մայրական մարսողական համակարգից անցնել այլ օրգաններ [35, 45, 149, 164]: Նման ֆիզիոլոգիական տեղաշարժը հիմնավորելու համար առաջարկվում է մի քանի մեխանիզմներ: Որոնցից մեկը որպես փոխադրամիջոց առաջարկում է դենդրիտային (DCs) և CD18⁺ բջիջները [150], որոնք կարող են աղիների լուսանցքից կապել ոչ ախտածին բակտերիաները և նրանց տեղափոխել այլ օրգաններ, ներառյալ կրծքի կաթնարտադրիչ ուղիներ: Մյուսը՝ առաջնահերթ է համարում իմունային բջիջների դերը, որոնք աղիքային համակարգից թափանցում են կաթնագեղձեր հղիության վերջին եռամսյակում այնուհետև ամբողջ և ակտացիայի ընթացքում [18]:

Վերջին *in vitro* և *in vivo* հետազոտությունների տվյալները հաստատում են այն վարկածը, որ առնվազն մի քանի մանրէներ կարող են ինտեգրվելով մայրական դենդրիտային բջիջների և մակրոֆագերի հետ կաթնագոյացման ուղիով անցնել կրծքագեղձեր և առաջացնել գաղութացում [107, 108, 113, 140, 149] (Նկ. 2):



Նկ

պր 2. Մայրական աղեստամոքսային համակարգից մանրէների անցման հավանական ուղիները դեպի նորածնի աղիներ [Rodríguez J. M., 2014]

Հղիության և լակտացիայի շրջանում կնոջ օրգանիզմում տեղի են ունենում հորմոնալ ֆիզիոլոգիական պրոցեսներ, որոնք ապահովում են սկզբում պտղի, իսկ հետագայում նորածնի առողջ զարգացումը: Այս փոփոխությունները ներառում են գրեթե բոլոր օրգան համակարգերը՝ սիրտ-անոթային, շնչառական, միզասեռական և մարսողական: Ենթադրվում է, որ նման փոփոխությունները կարող են նպաստել մանրէների տեղափոխմանը կանթնաարտադրիչ գեղձեր հղիության վերջին եռամսյակում և լակտացիայի ամբողջ ընթացքում: Սիրտ-անոթային համակարգի փոփոխությունները անհրաժեշտ են պտղի նորմալ զարգացումը ապահովելու, հորմոնալ փոփոխությունները՝ աղիքային նորմալ միկրոբիոտայի ձևավորման համար:

Հղիության վերջին եռամսյակում ներորովայնային ճնշման բարձրացման և հորմոնալ փոփոխությունների հետևանքով

թուլանում է աղիների շարժունակությունը, որի հետևանքով մեծանում է աղիներից կաթնագեղձեր միկրոբների տեղափոխման հավանականությունը [6]: Կաթնագեղձում, ծորաններում, արեոլում և պտուկում տեղի ունեցող անատոմո-ֆիզիոլոգիական փոփոխությունները նույնպես կարող են նպաստել նորածնի սպեցիֆիկ միկրոֆլորայի ձևավորմանը: Այսպիսով, ապացուցվում է աղիքային համակարգի և կաթնագեղձերի միջև ֆունկցիոնալ կապի գոյությունը [80, 149]: Նշված է, որ եթե հղիության 6 – րդ ամսից սկսած կինը պարբերաբար պերօրալ ընդունի որոշակի պրոբիոտիկ շտամի կամ շտամների պատրաստուկ, ապա նրանք մեծամասամբ հայտնաբերվում են մայրական կաթում [5, 8, 11, 18, 41, 53, 59, 148, 167]:

Մայրական կաթի մանրէները համարվում են առաջիններից, որ գաղութացնում են նորածինների աղեստամոքսային համակարգը՝ կանխելով և կանխարգելելով ախտածին մանրէների աճը, հետևաբար իջեցնում են ինֆեկցիոն հիվանդություններով հիվանդանալու ռիսկը: Կրծքի կաթում առկա մանրէներով է պայմանավորված մայրական կաթով և արհեստական խառնուրդներով սնված երեխաների աղիքային միկրոբիոտաների կազմի կտրուկ տարբերությունները: Կարելի է համարել նաև, որ մայրական կաթի մանրէները նպաստում են աղիների լորձաթաղանթում լիմֆոյիդ հյուսվածքի ձևավորմանը, որոնք ունեն կանխարգելիչ և հակաալերգիկ ազդեցություն:

1.5. Բնական և մայրական կաթի պրոբիոտիկների դերն աղիներում որպես պրոբիոտիկ շտամների աճի խթանիչներ

Բացի պրոբիոտիկներից աղեստամոքսային համակարգը կարգավորելու գործընթացում մեծ դեր ունեն սննդային հավելումները՝ պրոբիոտիկները, որոնք ընտրողաբար յուրացվում են օգտակար միկրոօրգանիզմների կողմից և նպաստում աղիքային միկրոֆլորայի կազմի, գործունեության բարելավմանը: «Պրոբիոտիկ» տերմինը առաջին անգամ օգտագործել է պրոֆեսոր Գլեն Գիբսոնը և Մարսել Ռոբերֆրոյիդը 1995թ.-ին: Պրոբիոտիկների շարքին հիմնականում դասվում են բնական դիետիկ մանրաթելերը (ինուլինը), օլիգոշաքարները (ֆրուկտոօլիգոշաքարները) և վերջերս մայրական կաթում հայտնաբերված

գալ ակտոօլ իգոշաքարները, որոնք խթանում են նորածնի աղիներում և պրոբիոտիկ բակտերիաների աճը [21, 22, 24, 25, 38, 69, 70, 71, 99, 168]: Կրծքագեղձում և ակտոբակտերիաների առկայությունը ամբողջականապես պրոբիոտիկ օլիգոշաքարների առաջացումը մայրական կաթում [99, 102]: Քանի որ կրծքի կաթը համարվում է պոտենցիալ պրոբիոտիկ ԿԹԲ-ների համար փոխադրամիջոց, ապա կարելի է համարել, որ օլիգոշաքարների առկայությունն այն վերածում է բնական սինբիոտիկ՝ պրոբիոտիկների և պրոբիոտիկների խառնուրդ հանդիսացող սննդի [115, 116, 117]:

Սինթետիկ պրոբիոտիկներից հայտնի է և ակտուել ոգը՝ բիֆիդոգեն գործոն անվան տակ: Պրոբիոտիկ և պրոբիոտիկ խառնուրդը, առավել արդյունավետ է ազդում աղեստամոքսային համակարգի օգտակար միկրոֆլորայի՝ և ակտոբակտերիաների և բիֆիդոբակտերիաների գործունեության վրա: Պրոբիոտիկները, պրոբիոտիկները և նրանց համադրումը՝ սինբիոտիկները և այնորեն կիրառվում են բժշկության մեջ, ինչպես շատ հիվանդությունների կանխարգելման, այնպես էլ բուժման նպատակով [13, 19, 37, 39, 46, 54, 69, 70, 103, 137, 157, 173]:

Ի տարբերություն պրոբիոտիկների, որոնք աղիներ ներմուծվելուց հետո պետք է մրցակցեն աղիքային կոմենսալ միկրոօրգանիզմների կայուն համայնքների դեմ, պրոբիոտիկների օգտագործման առավելությունը կայանում է աղիների ֆունկցիոնալ փոփոխության մեջ, որտեղ թիրախային բակտերիաները աղիներում արդեն իսկ կոմենսալ են: Արդյունքում, պրոբիոտիկը աղիքային համակարգի վերափոխման համար թերևս ավելի արակտիկ և արդյունավետ միջոց է, քան պրոբիոտիկը: Սակայն մյուս կողմից, որոշ հիվանդությունների և տարիքային փոփոխությունների դեպքում՝ ինչպիսիք են ծերությունը, հակաբիոտիկային կամ դեղորայքային թերապիան, երբ առողջությունը խթանող մանրէները բացակայում են աղիներում, պրոբիոտիկների կիրառության արդյունավետությունը դառնում է քիչ հավանական [75, 88, 92, 96, 98]:

Մայրական կաթից անջատված պրոբիոտիկ բակտերիաները և օլիգոշաքարները առանձին-առանձին, ինչպես նաև որպես սինբիոտիկ առաջարկվում է օգտագործել հղի կանանց և երեխաների

միկրոֆլորայի որակական հատկանիշների բարելավման նպատակով: Վերջին ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ սկսած հղիության վեցերորդ ամսից ամեն օր պերօրալ եղանակով ընդունված առողջ կանանց մայրական կաթից անջատված պրոբիոտիկ մանրէները ի վերջո հայտնաբերվում են խիժում և հասուն կաթում [84]: Մանկական սնունդ արտադրող ձեռնարկությունները, մայրական կաթին նմանակելու համար հետազոտություններ են տանում մանկական խառնուրդները կենսունակ պրոբիոտիկ մանրէներով և մայրական կաթի օլիգոշաքարներով հավելելու ուղղությամբ: ԱՄՆ-ում և որոշ եվրոպական երկրներում մայրական կաթը պահեստավորում են: Սակայն, վերամշակման ընթացքում կաթում գոյություն ունեցող օգտակար միկրոօրգանիզմները ոչնչանում են և կարիք է զգացվում երեխային լրացուցիչ պրոբիոտիկներ նշանակելու:

ԳԼՈՒԽ 2. ՆՅՈՒԹԵՐ ԵՎ ՄԵԹՈԴՆԵՐ

2.1. Սննդային միջավայրեր, լուծույթներ և ռեակտիվներ

Միջավայրերը՝ LAPTg ազար և արգանակ [169], մոդիֆիկացված LAPT-M` (գ/լ) պեպտոն-5, տրիպտոն-5, շաքարասնկային էքստրակտ-3, Տվին 80 - 1 մլ, տրիպտոգ ազար (Ferak Berlin), լիարժեք արգանակ՝ Nutrient broth standart 1 (Serva), Էյկմանի միջավայրը [181], Սաբոուրո միջավայր (Serva, Berlin), MRS (deMan, Rogosa and Sharpe) և M16 ազար (HiMedia, India): Նյութերը՝ մեթիլեն կապույտ, Լեդի (Micromaster), ազար (Difco, Germany) Գրամի ներկման հավաքածու (Gram Staining Set, Ghatran, IIR), ջրածնի պերօքսիդ (H_2O_2), օքսիդազային սկավառակներ (HiMedia), յուղազերծ կաթ, L- արգինին (Sigma), գլյուկոզ, արաբինոզ, գալակտոզ, քսիլոզ, լակտոզ, ցելոբիոզ, սորբիտ, սախարոզ, սալիցին, ռամնոզ, մելիցիտոզ, մելիբիոզ, մաննիտ, մալտոզ, NaCl, NaOH, $NaHCO_3$, $NaHPO_4$, K_2HPO_4 , KOH, KI, HgI_2 , $MgSO_4$, HCl, Էթիլ սալիքտ 96%, թթու ֆոսֆին, ֆենոլ ֆթալեին, քսիլոլ (Kemika, Croatia), գու միարաբիկ (*Acacia senegal* L.) (Acacia, NF, Medisca, USA), ծիրանենու կամեդ (*gummi armeniaceae*) (ԵՊԲՀ Ֆարմակոգնոզիայի ամբիոն), լակտուլոզ (Solvay pharma, Duphalac), Անդրեդեի ինդիկատոր, Նեսսլերի ռեակտիվ, քլորիդօքսիդին գլյուկոնատ 0.1% և մանրէազերծ թղթե սկավառակներ – 5 մմ: Հակաբիոտիկներ՝ ստրեպտոմիցին, կլինդամիցին, վանկոմիցին, Էրիթրոմիցին, ցիպրոֆլոքսացին, մետրոնիդազոլ, ռիֆամպիցին ներծծված ստանդարտ սկավառակներ - 6մմ (Serva, ԳԴՀ):

2.2. Մանրէային կուլտուրաներ

Escherichia coli MDC 5003, *Candida albicans* MDC 8013, *Staphylococcus aureus* MDC 5233 թեստ կուլտուրաներ, որոնք ստացվել են ՀՀ ԳԱԱ «Հայ կենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ - ի «Մանրէների Ավանդադրման կենտրոնից»: Կաթնաթթվային բակտերիաների շտամները անջատվել և նույնականացվել են այս աշխատանքում:

2.3. Մայրական կաթի նմուշ առումը

Կրծքի կաթի նմուշները վերցվել են պահպանելով ասեպտիկայի բոլոր կանոնները՝ նախորոք օճառով և ջրով լվացվել են ձեռքերը, հետո կրծքի արեոլը և պտուկը, սրբվել մանրէազերծ թանգիվով և վերջում քլորհեքսիդին գլյուկոնատի 0.1% լուծույթով: Մանրէազերծ թանգիվով չորացնելուց հետո, մոտ 0.5 մլ կաթը թափել է՝ մաշկից անցած աղտոտվածությանից խուսափելու համար: Կաթը 2-3 մլ ձեռքով արտամղվել է մանրէազերծ փորձանոթի մեջ, տեղադրվել սառույցով տարայի մեջ, 1 ժամվա ընթացքում հասցվել է արբորատորիա և անմիջապես սկսվել են ուսումնասիրությունները:

2.4. Մայրական կաթի կուլտիվացվող մանրէների քանակության որոշումը

Կուլտիվացվող բակտերիաների քանակը կրծքի կաթում որոշվել է տասնապատիկ նոսրացումները Պետրիի թասիկի մեջ լցնելու մեթոդով (Pour plate method): Բակտերիալ կախույթը 1 մլ քանակով պիպետի միջոցով տեղադրվում է թասիկի կենտրոնում: Հալեցված և սառեցված մինչև 46°C MRS ագարը զգուշորեն խառնելով լցվում է վրան և պնդանալուց հետո տեղադրվում թերմոստատ: Չուգահեռաբար նոսրացումները ինոկուլացվել են մանրէազերծ կովի կաթում և ինկուբացվել 37°C - ի տակ: Մանրէների տիտրերը որոշվել է MRS ագարում աճած գաղութների քանակով և ֆերմենտացված կաթի փորձանոթների քանակով:

2.5. Մայրական կաթից մանրէների մաքուր կուլտուրաների անջատումը

Մայրական կաթի նմուշներից կատարվել է ցանքս MRS և LAPT-ց սելեկտիվ ագարային միջավայրերի վրա, պատահական (ռանդոմ) եղանակով անջատվել են գաղութներ, որոնց մոտստուգվել են կովի կաթը մակարդեղու հատկությունը, Գրամով ներկվելու ունակությունը, կառավ ազային և օքսիդազային ռեակցիաները: Գրամդրական, կառավ ազա և օքսիդազա բացասական շտամները առանձնացվել են հետագա ուսումնասիրությունների համար:

2.6. Գրամով ներկումը և մանրադիտակային հետազոտությունը

Սել Եկտիվ ագարային միջավայրերում աճած գաղութներից պատրաստել ենք քսուկներ, ներկել Գրամով ներկման հավաքածույով՝ համաձայն արտադրողի հրահանգների և հետազոտել MB1-3 մանրադիտակի տակ ֆազային – կոնտրաստով 100 անգամ խոշորացմամբ:

2.7. ԿԹԲ-ների կայունությունը NaCl-ի նկատմամբ

Հետազոտվող շտամների գիշերային կուլտուրաները 0.1 մլ ավելացվել են 4 % և 6.5 % NaCl պարունակող 2մլ LAPTց արգանակի մեջ և ինոկուլացվել 37°C 48 ժամ: Շտամների աճը որոշվել է պլտորոնյամբ [178]:

2.8. ԿԹԲ-ների կայունությունը լեղուկ նկատմամբ

Պատրաստվել է 2 % և 4% - անոց լեղի պարունակող կաթ: Հետազոտվող շտամների առանձին գաղութներից օդասեղով ցանվել է լեղիով կաթում և ինոկուլացվել 37°C 48 ժամ: Կայունությունը գնահատվել է կաթի մակարդմամբ [178, 181]:

2.9. Տարբեր pH-ի նկատմամբ կայունությունը

pH-ի նկատմամբ կայունությունը որոշվել է 2 – 9.2 տիրույթում LAPTց արգանակում, pH-ները HCl –ի և NaOH-ի միջոցով հասցվել է անհրաժեշտ տիրույթի: Գիշերային կուլտուրաներից 0.1 մլ ցանվել ենք 2 մլ համապատասխան pH-ով միջավայրում և ինոկուլացրել 37°C 48 ժամ: Կուլտուրաներ աճը որոշվել է պլտորոնյամբ [178, 179]:

2.10. ԿԹԲ-ների կայունությունը 0.1 % մեթիլ են կապրոյտի նկատմամբ

Պատրաստվել է յուղազերծ կաթի և 0.1 %-անոց մեթիլ են կապրոյտով միջավայր, 2 մլ միջավայրին ավելացվել են 0.1 մլ գիշերային կուլտուրա և ինոկուբացվել 37°C 48 ժամ: Կայունությունը գնահատվել է միջավայրի գունազրկմամբ և կաթի մակարդմամբ [178, 180]:

2.11. ԿԹԲ-ների կողմից արգինինից ամոնիակի առաջացման որոշումը

Պատրաստվել է 100 մլ թորած ջրում 0.5 գ պեպտոն, 0.2գ K_2HPO_4 , 0.05գ գլյուկոզ և 0.3գ L- արգինին պարունակող մանրէազերծ միջավայր: Գիշերային կուլտուրաներից 0.1մլ ավելացվել է 2 մլ պատրաստի միջավայրի վրա և ինուկուբացվել $37^{\circ}C$ 48 ժամ: Աճած կուլտուրաները կաթեցվել է առարկայական ապակու վրա, ավելացվել է մեկ կաթիլ Նեսսլերի ռեակտիվ, ամիակի առաջացման դեպքում առաջանում է նարնջագույն նստվածք [178, 180]:

2.12. ԿԹԲ-ների ջերմակայ ու նության որոշումը

LAPTg կամ MRS 1.8 մլ միջավայրին ավելացրել ենք 0.2 մլ գիշերային կուլտուրա և ինկուբացվել $4^{\circ}C$, $10^{\circ}C$, $15^{\circ}C$, $30^{\circ}C$, $37^{\circ}C$ նաև $45^{\circ}C$, $50^{\circ}C$, $55^{\circ}C$ և $60^{\circ}C$ ջերմաստիճանների տիրույթներում 48 ժամ: Ջերմակայ ու նությունն որոշվել է պլտորոթյամբ:

2.13. ԿԹԲ-ների կողմից ածխաջրերի յուրացման որոշումը

Նախորոք պատրաստվել է 18 տարբեր շաքարների 20 % մանրէազերծ լուծույթներ, Անդրեդեի ինդիկատոր՝ 100մլ թորած ջուր, 0.5 գ թթու ֆոսֆսին, 15 մլ 4 % NaOH և մեկ օր մնացել է սենյակային ջերմաստիճանում, այնուհետև ավելացվել է 1 մլ 4 % NaOH և ստերիլ իզացվել: 100մլ LAPT-M ագարային միջավայրին ավելացրել ենք 1մլ Անդրեդեի ինդիկատոր: Նախորոք 0.5 մլ քանակությամբ շաքարների լուծույթները լցրել ենք Պետրիի թասերը և ավելացրել 20 մլ LAPT-M Անդրեդեի ինդիկատոր պարունակող միջավայր: Ռեպլիկատորների խոռոչները լցվել են 0,2 մլ հետազոտվող գիշերային կուլտուրաներով, թաթախվել են ելուստներն և փոխադրվել Անդրեդեի ինդիկատոր պարունակող LAPT-M ագարի վրա: Շաքարների յուրացումը գնահատվել է գաղութների աճի ինտենսիվությամբ և նրանց շուրջ առաջացած վարդագույն երանգավորմամբ:

2.14. ԿԹԲ-ների կաթի մակարդման արագություն և որոշումը

Յուղացերծ կաթի 2 մլ նմուշները ինոկուլացվել են 0.1 մլ գիշերային կուլ տուրաներով և ինոկուլացվել 37°C -ում: 3 ժամ անց ժամը մեկ անգամ ստուգվել է կաթի մակարդումը [178, 180]:

2.15. Պոտենցիոմետրիկ և տիտրացվող թթվայնությունների որոշումը

Պոտենցիոմետրիկ թթվայնությունը որոշվել է Checker pH-մետրի (HANNA Instruments Inc., ԱՄՆ) օգնությամբ, իսկ տիտրացվողն՝ ըստ Թյորների [6]:

2.16. ԿԹԲ-ների կառավարող ազային ակտիվություն և որոշումը

Կառավարող ազային ակտիվությունը որոշվել է առարկայական ապակու վրա կաթացնելով 0.3 % ջրածնի պերօքսիդ, որի վրա գաղութից օդասեղով տեղադրվում է հետազոտվող կուլ տուրան: Պղպեղակներ առաջացնող շտամները համարվում կառավարողական:

2.17. ԿԹԲ-ների աճի արագություն և որոշումը

Գիշերային կուլ տուրաները 1:20 հարաբերությամբ նոսրացվել են թարմ MRS կամ LAPTց արգանակում՝ Էրլենմեյերի 200մլ անոթում, և աճեցվել ճոճանակով ջրային բաղնիքում ինտենսիվ խառնման պայմաններում: Պարբերաբար չափվել են նմուշների ՕԽ-ները ՖԵԿ-26-ի վրա λ=590 նմ ալիքի երկարությամբ տակ:

2.18. Լակտոբացիլների RAPD ՊՇՌ-նույննականացումը

Ընտրված ցուպիկային շտամներից անջատված ԴՆԹ-ի հատուկ պրայմերներով ՊՇՌ ամպլիֆիկացիայի արդյունքում 3-4 ժամվա ընթացքում սինթեզվել են 1 մլ-ով 10^8 ամպլիֆիկոններ (կրկնօրինակներ): Ժելադարոգային - Էլեկտրոֆորեզի միջոցով ստուգվել է ՊՇՌ-ի արդյունքները: Էլեկտրոֆորեզի ավարտից հետո ՈՒՄ-դիապազոնում ճառագայթող տրանսիլյումինատորի ֆիլտրի վրա է տեղադրվել ժելային թիթեղը: Ամպլիֆիկացիայի արգասիքների գծերը համեմատվել են ժել - Էլեկտրոֆորեզի արդյունքում

առաջացած ժել գծերի և երևացող յուրահատուկ պրայմերների գծերի հետ [165, 182]:

2.19. ԿԹԲ-ների հակամանրեայ ին ակտիվություն ու մը

Հակամանրեայ ին ակտիվությունը որոշելու համար գիշերային կուլտուրաները 1:20 հարաբերությամբ նստեցվել է 3000 պտվ կենտրոնախույսման միջոցով և վերնստվածքային հեղուկներով թրջված թղթե սկավառակները տեղադրվել են թեստ-կուլտուրաներով ինոկուլացված տրիպտոգ ագարի վրա: Թասիկները դրվել են սառնարան 2 ժամ, այնուհետև տեղափոխվել թերմոստատ 37°C. Հաջորդ օրը, չափվել են թեստ-կուլտուրաների աճի ճնշման գոտիները:

2.20. Պրոտեոլիտիկ ակտիվություն ու մը

Պրոտեոլիտիկ ակտիվությունը որոշվել է ԿԹԲ շտամների գիշերային կուլտուրաների վերնստվածքային հեղուկներով թրջված թղթե սկավառակների տեղադրումով կաթի հիմքով պատրաստած Էյկմանի ագարային միջավայրի մակերեսին և ինոկուլացվել 37°C - ում 48 ժամ: Սկավառակների շուրջ կազեինների պրոտեոլիզի արդյունքում առաջացած թափանցիկ գոտիների առկայությունը վկայում է նրանց պրոտեոլիտիկ ակտիվության մասին [180, 181]:

2.21. Հակաբիոտիկների նկատմամբ զգայնություն ու մը

Հետազոտվող շտամների հակաբիոտիկների նկատմամբ կայունությունը որոշվել է թղթե սկավառակներով՝ դիֆուզիայի մեթոդով: Հետազոտվող բակտերիալ կախույթը որոշակի քանակությամբ տարածել ենք ագարի վրա, այնուհետև տեղադրվել են ստանդարտ քանակությամբ հակաբիոտիկներ պարունակող սկավառակներ և ինոկուլացրել 37°C - ում: 24 ժամ ինոկուլացիայից հետո չափվել են սկավառակների շուրջ առաջացած ճնշման գոտիները մմ-ով: Սկավառակի տրամագիծը 6մմ է:

2.22. Մայրական կաթում մանրէների քանակական փոփոխությունների որոշումը կախված կերակրման ժամանակահատվածից *in vivo*

Այդ նպատակով լակտացիայի երկրորդ ամսում գտնվող կնոջը ինդրել ենք չկերակրել մի կրծքով 12 ժամ: Առաջին նմուշը վերցվել է կերակրելուց առաջ, մյուսը անմիջապես կերակրելուց հետո, իսկ երրորդ՝ նմուշը՝ 12 ժամյա կերակրման դադարից հետո, իսկ չորրորդը՝ 3 ժամ անց: Նմուշներում մանրէների քանակությունը որոշվել է MRS ագարում և կովի կաթում ցանքսի միջոցով:

2.23. Մայրական կաթի ռեզիդենտմանրէների աճի որոշումը *ex vivo*

Մայրական կաթի նմուշները տեղադրվել են թերմոստատ 37°C –ի տակ և երեք օրերի ընթացքում 12 ժամյա ընդմիջումներով որոշվել է կուլտիվացվող մանրէների քանակը՝ MRS ագարում և մանրէազերծ կովի կաթում:

2.24. Պրեբիոտիկների ազդեցությունը ԿԹՔ-ների աճի վրա

Սինթետիկ պրեբիոտիկ՝ լակտուլոզ և բնական՝ ծիրանենու կամեդ, գումի արաբիկ պարունակող 10% խտությամբ լուծույթները ավելացվել են LAPT-M միջավայրին, 1:20 հարաբերությամբ, որտեղ ինոկուլացվել են հետազոտվող գիշերային կուլտուրաները և աճեցվել Էրլենմեյերի 200 մլ անոթներում ճոճանակով ջրային բաղնիքում 37 °C ջերմաստիճանում: Օպտիկական խտությունների չափման միջոցով որոշվել է կենսազանգվածի կուտակման դինամիկան: 7 ժամյա աճից հետո փորձը շարունակվել է և 24 ժամ անց չափվել ՕԽ-ը:

2.25. ԿԹՔ-ների երկարաժամկետային պահպանումը

Անջատված շտամները որպես աշխատանքային նմուշ պահպանվում են սառնարանում ագարի վրա և կաթի մեջ, իսկ երկարաժամկետային պահպանումը իրականացվում է սառցախցիկում Էպենդորֆի 2 մլ-ոց սրվակների մեջ՝ կաթնային միջավայրում (13 %

յուղագերծ կաթ, 10գ/լ խմորասնկային էքստրակտ, 5 գ/լ գլյուկոզ): Գիշերային կուլտուրան միջավայրին ավելացվում է 1:4 հարաբերությամբ:

2.26. Ստացված տվյալների վիճակագրական մշակումը

Բոլոր փորձերը կատարվել են 3-5 կրկնությամբ և ստացված տվյալները ենթարկվել են հավաստիության գնահատման վիճակագրական մշակման ըստՍտյուդենտի թեստի և օգտագործվել է R Project for Statistical Computing version R 3.1.1 ծրագրիչը: Ստացված արդյունքների գրաֆիկական կառուցումը կատարվել է Microsoft Office Excel 2013 համակրգչային ծրագրով: Աշխատանքում ստացված տվյալները համարվում են հավաստի $p < 0.05$, եթե հետագայում այլ արժեքներ չեն դիտարկվել:

ԳԼՈՒԽ3. ՓՈՐՁԱՐԱՐԱԿԱՆ ՄԱՍ

3.1. ԿԹԲ-ների մաքուր կուլտուրաների ստացումը

Պահպանելով ասեպտիկայի և անտիսեպտիկայի կանոնները մի քանի օրվա 23 առողջ 22-28 տարեկան երևանում և նրա արվարձաններում բնակվող ծննդկաններից վերցված կաթի նմուշները նոսրացումներով ցանվել են յուղագերծ կովի կաթում, սելեկտիվ ագարային LAPTg, MRS և ոչ սելեկտիվ NB միջավայրերում, վերջինիս ցանվել են կաթնաթթվային բակտերիաներից բացի այլ միկրոօրգանիզմների հայտնաբերման համար, այնուհետև մայրական կաթի նմուշի հետինկուբացվել 1–3 օր 37°C – ում:

Մայրական կաթի բոլոր նմուշներում հայտնաբերվել է $10^4 - 10^5$ ԳԱՄ/մլ միկրոօրգանիզմների առկայություն: Բոլոր միջավայրերում և կովի կաթում մանրէների հավասար աճը վկայում է կաթնաթթվային բակտերիաների գերակայության մասին: Կովի կաթում արված 10^{-4} նոսրացումներում տեղի է ունեցել կաթի

մակարդում, ինչը վկայում է մայրական կաթում ԿԹԲ – ների դոմինանտության մասին (Աղ. 6):

Աղյուսակ 6

Մայրական կաթի նոսրացումները տարբեր միջավայրերում

Միջավայր	Նոսրացումներ			
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
Կովի կաթ	+++	+++	+++	+++
LAPTg	++	++	++	++
MRS	++	++	+++	+++
NB	+++	++	++	+++
Գաղութների քանակը	4000	300-500	30-50	3-5
Ընդհանուր ԳԱՄ/մլ	$4.0 (\pm 1.5) \times 10^5$			

Կաթնաթթվային բակտերաների մաքուր կուլտուրաներ ստանալու նպատակով վերջին նոսրացումներից սելեկտիվ միջավայրերի վրա աճած գաղութներից կատարվել է պատահական ընտրություն և ստուգվել է նրանց Գրամով ներկվելու հատկությունը: Հետագա ուսումնասիրությունների համար ընտրված 20 գրամդրական շտամների մանրադիտակային ուսումնասիրությունը ցույց տվեց, որ դրանցից 12 - ը կոկեր են (60%), իսկ 8 - ը ցուպիկներ (40%):

3.2. Լակտոբացիլների մորֆոմետրիկ և տեխնոլոգիական հատկությունները

Լակտոբացիլների մորֆոլոգիան և կաթի ֆերմենտացիան ներկայացված են Աղ. 7-ում:

Աղյուսակ 7

Լակտոբացիլների մորֆոմետրիկ հատկանիշները և կաթի ֆերմենտացիան

ԼԲ շտամ	Գաղութների մորֆոլոգիան	Բջջերի մորֆոլոգիան	Կաթի ֆերմենտացիան
---------	------------------------	--------------------	-------------------

	Տեսքը	Չափսերը, մմ	Տեսքը	Չափսերը, մկմ	+++
LH14	Կաթնագույն	2.0-3.0	Ցուպիկներ, կարճ շղթաներ	0.5 x 2.5	+++
LH15	Կաթնային սպիտակ	2.0-2.5	Ցուպիկներ, կարճ շղթաներ	0.7 x 3.0	+++
LH 25	Կաթնագույն	1.0-1.5	Ցուպիկներ, կարճ շղթաներ	1.0 x 2.5	+++
LH 26	Կաթնագույն սպիտակ	2.0-2.5	Ցուպիկներ	1.0 x 3.0	+++
LH 27	Կաթնագույն	1.0-2.0	Ցուպիկներ, երկար շղթաներ	1.0 x 1.5	+++
LH 28	Սպիտակ	2.5-3.0	Ցուպիկներ, երկար շղթաներ	1.0 x 3.0	+++
LH 29	Կաթնագույն	1.0 -1.5	Ցուպիկներ	0.5 x 1.0	+++
LH 32	Թափանցիկ փոքր	1.5-2.0	Ցուպիկներ	0.5 x 1.0	+++

Փորձերի արդյունքում պարզ դարձավ, որ անջատված լակտոբացիլները տարբերվում են իրենց գաղութների և բջիջների չափսերով: Գաղութները տարբերվում են ինչպես տեսքով ու գույնով, այնպես էլ չափսերով, առանձնացվում են 4 հիմնական խմբերի՝ կաթնագույն 1.0 – 3.0 մմ, կաթնագույն սպիտակ 2.0 – 2.5 մմ, սպիտակ 2.5 – 3.0 մմ, թափանցիկ փոքր 1.5 – 2.0 մմ: Մանրադիտակային ուսումնասիրությունը ցույց տվեց, որ անջատված լակտոբացիլները տարբերվում են բջիջների չափսերով և տեսքով՝ միայնակ, երկար և կարճ շղթաներ առաջացնող ցուպիկներ: Բոլոր լակտոբացիլները ֆերմենտացնում են կաթը առաջացնելով պինդ և համասեռ մակարդուկ (+ թույլ, ++ միջին, +++ լավ):

3.2.1. Լակտոբացիլների օքսիդազային, կատալազային ակտիվությունները և արգինինից ամոնիակի առաջացման ու սուլֆհիդրատի ակտիվությունը, Գրամով ներկումը

Մայրական կաթից անջատված ԼԲ-ների օքսիդազային, կատալազային ակտիվությունները, արգինինից ամոնիակի առաջացման ու սուլֆհիդրատի ակտիվությունը և Գրամով ներկումը ներկայացված է Աղ. 8-ում:

Աղյուսակ 8

Լակտոբացիլների օքսիդազային, կատալազային ակտիվությունները, արգինինից NH₃ առաջացման ու սուլֆհիդրատի ակտիվությունը և Գրամով ներկումը

ԼԲ շտամ	Կատալազային ակտիվություն	Օքսիդազային ակտիվություն	Արգինինից NH ₃ առաջացումը	Ներկումն ըստ Գրամի
LH14	-	-	+	+
LH15	-	-	+	+
LH25	-	-	+	+
LH26	-	-	+	+
LH27	-	-	+	+
LH28	-	-	+	+
LH29	-	-	+	+
LH32	-	-	+	+

Ինչպես երևում է աղյուսակից բոլոր Լակտոբացիլները կատալազա օքսիդազաբացասական են, գրամդրական են և արգինինից ամոնիակ առաջացնում են բոլոր շտամները:

3.2.2. Լակտոբացիլների ֆիզիոլոգիական և կուլտուրալ հատկությունները

Մայրական կաթից անջատված Լակտոբացիլների ֆիզիոլոգիական և կուլտուրալ հատկությունները ներկայացված են Աղ. 9-ում:

Աղյուսակ 9

Լակտոբացիլների աճը և կայունությունը միջավայրի տարբեր պայմաններում

ԼԲ շտամ	Աճը տարբեր C°			Աճը NaCl- ում %		Աճը pH- ում		Աճը լեղիով կաթում, %		0.1%- ոց ՄԿ կաթում
	10	45	50	4.0	6.5	2	9.2	2	4	
LH14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LH15	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LH25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LH26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LH27	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LH28	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LH29	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
LH32	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-

Փորձի արդյունքներից երևում է (Աղ. 9), որ 10 °C-ում աճը բացակայում է ԼԲ-ների միայն 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 փորձարկված լակտոբացիլների բոլոր շտամները, 0.1% մեթիլեն կապույտ պարունակող կաթում աճում է միայն մեկ շտամ, լակտոբացիլների երկու շտամ զգայուն է 6.5% NaCl-ի հանդեպ:

3.2.3. Լակտոբացիլների կաթի մակարդման արագությունը և մակարդուկների սիտրացվող թթվայնությունը

Լակտոբացիլների կաթի մակարդման արագությունն ուսումնասիրվել է 37°C-ի տակ: Տիտրացվող թթվայնությունն որոշվել է ըստ Թյորոների (°T), մակարդված կաթի նմուշները 4 ժամ սառնարանում պահելուց հետո: °T-ի մեկ միավորը համապատասխանում

Է 9մգ կաթնաթթվին 100մլ -ում: Արդյունքները ներկայացված են Աղ. 10-ում:

Աղյուսակ 10

Լակտոբացիլների կաթի մակարդման արագությունը նև ու մակարդի տիտրացվող թթվայնությունը, ըստՑորների (°T)

ԼԲ շտամ	Ժամ						°T
	4	5	6	7	8	24	
LH14	-	-	-	-	-	+	105±10
LH15	-	+	+	+	+	+	100±10
LH25	-	-	-	-	-	+	120±10
LH26	-	-	-	-	-	+	110±10
LH27	-	-	-	-	+	+	118±10
LH28	-	-	-	-	+	+	97±5
LH29	-	-	-	-	+	+	110±10
LH32	-	-	-	-	-	+	100±5

Ուսումնասիրությունների արդյունքում պարզվեց, որ LH15 շտամը կաթը մակարդում է 5 ժամում, LH27, LH28, LH29 շտամները՝ 8, իսկ մնացած 4 շտամները 24 ժամվա ընթացքում: Առավել բարձր թթվություն օժտված են LH25 և LH27 շտամները 118 և 120 °T, 2 շտամի՝ LH15 և LH32 –ինը 100 °T, մեկ շտամի LH14-ինը հասնում է 105 °T, իսկ LH26 և LH29 շտամներինը՝ 110 °T:

3.2.4. Լակտոբացիլների ածխաջրերի յուրացման արոֆիլը

Ուսումնասիրվել է անջատված Լակտոբացիլների կողմից 18 տարբեր ածխաջրերի յուրացումը, որը նրանց նույնականացման գլխավոր չափանիշներից մեկն է: Արդյունքները ներկայացված են Աղ. 11-ում:

Աղյուսակ 11

Լակտոբացիլների ածխաջրերի յուրացման արոֆիլը

ԼԲ շտամբ	Արաբիկոգ	Ցելոբիոգ	Ֆրուկտոգ	Գալակտոգ	Գլյուկոկոգ	Լակտոգ	Մալտոգ	Մաննիտ	Մելիզիտոգ	Մելիբիոգ	Ռաֆինոգ	Ռամնոգ	Ռիբոգ	Սալիցին	Սորբիտ	Սախարոգ	Տրեգալոգ	Քսիլոգ
LH14	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
LH15	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+
LH25	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
LH26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-
LH27	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
LH28	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+
LH29	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
LH32	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-

Ինչպես երևում է աղյուսակ 11-ից, անջատված ԼԲ-ները տարբերվում են ածխաջրերի յուրացման պրոֆիլով: Այսպես, LH14 շտամը յուրացնում է արաբիկոգ, ֆրուկտոգ, գլյուկոկոգ, Լակտոգ և սախարոգ, LH15 շտամը յուրացնում է բոլոր շաքարները բացի մաննիտից, մելիբիոզից, ռամնոզից, սալիցինից, սորբիտից և տրեգալոզից: LH25 շտամը չի յուրացնում արաբիկոգ, մելիբիոգ, ռաֆինոգ, ռիբոգ և քսիլոգ շաքարները, LH26 շտամը յուրացնում է բոլոր շաքարները, բացի մելիբիոզից, ռաֆինոգ, ռիբոզից և քսիլոզից: LH27 շտամը համապատասխանաբար յուրացնում է ֆրուկտոգ, գալակտոգ, գլյուկոկոգ, մալտոգ, մաննիտ, մելիբիոգ, ռաֆինոգ, ռամնոգ, սախարոգ, և տրեգալոգ: LH28 շտամը չի յուրացնում

ցելոբիոզ, մելիզիտոզ, մելիբիոզ, սալիցին, սորբիտ և սախարոզ, LH29 շտամը չի յուրացնում ցելոբիոզ, մելիբիոզ, մելիբիոզ, ռաֆինոզ, ռամնոզ շաքարները: LH32 շտամը յուրացնում է հետևյալ շաքարները՝ ֆրուկտոզ, գալակտոզ, գլյուկոզ, լակտոզ, մալտոզ, մելիբիոզ, ռիբոզ և սախարոզ:

3.2.5. Անջատված լակտոբացիլների մետաբոլիկ հատկությունների վերլուծությունը և նույնականացումն ըստՔերջիի բակտերիաների որոշիչի

Վերը ներկայացված հատկությունների համադրման և վերլուծության հիման վրա իրականացվել է անջատված ԼԲ շտամների նույնականացումն համաձայն Քերջիի բակտերիաների որոշիչի (Աղ. 12) [100]:

Աղյուսակ 12

Լակտոբացիլների տեսակային պատկանելիությունն ըստ Քերջիի որոշիչի

ԼԲ տեսակը	Շտամները	Քանակը
<i>Lactobacillus casei</i>	LH25, LH26, LH28, LH29	4
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	LH14	1
<i>Lactobacillus fermentum</i>	LH15	1
<i>Lactobacillus salivarius</i>	LH27	1
<i>Lactobacillus reuteri</i>	LH32	1

ԼԲ-ներից չորսը՝ LH25-ը, LH26-ը, LH28-ը և LH29-ը պատկանում են *Lactobacillus casei*, LH14-ը՝ *Lactobacillus delbrueckii*, LH15-ը՝ *Lactobacillus fermentum*, LH27-ը՝ *Lactobacillus salivarius*, LH32-ը՝ *Lactobacillus reuteri* տեսակներին:

Ինչպես երևում է աղյուսակից, մեր կողմից ուսումնասիրված կանանց կաթի նմուշներում առկա են տարբեր տեսակների պատկանող լակտոբացիլներ, որտեղ գերակայող են *Lactobacillus casei*-ի պատկանող տեսակները:

3.2.6. Լակտոբացիլ ների նույն նականացումը RAPD ՊՇՌ-ի միջոցով

Սպեցիֆիկ տեսակային պրայմերների միջոցով իրականացվել է նրանց ԴՆԹ-ի պատահական ՊՇՌ ամպլիֆիկացիա (Աղ. 13):

Աղյուսակ 13

Լակտոբացիլ ների տեսակային համապատասխանելիությունը RAPD ՊՇՌ-ի միջոցով

ԿԹՔ շտամ	ԿԹՔ տեսակին համապատասխանությունը	Համապատասխանություն 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 Աղ.13-ից, *L. casei* տեսակին պատկանող չորս շտամներից երեքի մոտ հայտնաբերվել է լրիվ 99/100 % համապատասխանելիություն, սակայն LH28 շտամի մոտ այն չի գերազանցում 93 %-ը: Քանի, որ շտամները անջատվել են տարբեր կանանց կրծքի կաթից որոշակի գենետիկական տարբերությունների առկայությունը չի բացառվում:

Կաթնաթթվային մանրէների նույն նականացումը դժվարանում է նրանով, որ Էվոլյուցիայի ընթացքում նրանք կորցրել են իրենց գենոմի մոտ 25%-ը և հորիզոնական փոխանցումների միջոցով ձեռք են բերել մոտ 600 գեներ, որոնք պատասխանատու են սննդանյութերի արագ յուրացման համար: Այդ պատճառով հաճախ 16 ռՆԹ-ի գեների մասնակի սեկվինացիան լիարժեք պատասխան չի տալիս շտամի տեսակային պատկանելիության վերաբերյալ: Որոշ հետազոտողների

պնդմամբ ավելի արդյունավետ է նրանց սպիտակուցային կազմի ուսումնասիրությունները: RAPD (Պոլիմորֆ ԴՆԹ-ի պատահական ամպլիֆիկացիա) մեթոդը լայն կիրառություն ունի միկրոօրգանիզմների նույնականացման համար [132]:

3.3. Մայրական կաթից մեկուսացված լակտոկոկերի ուսումնասիրությունը

3.3.1. Լակտոկոկերի մորֆոմետրիկ և տեխնոլոգիական հատկությունները

Լակտոկոկերի մորֆոլոգիան և նրանց կողմից կաթը ֆերմենտացնելու հատկությունը ներկայացված է (Աղ. 14-ում):

Ինչպես երևում է աղյուսակ 14-ից, անջատված լակտոկոկերն իրենց բջիջների և ագարային միջավայրի վրա առաջացրած գաղութների գույնով ու մորֆոմետրիկ հատկություններով տարբերվում են միմյանցից:

Մանրադիտակային ուսումնասիրությունները ցույց տվեցին, որ անջատված լակտոկոկերը տարբերվում են բջիջների չափսերով և շղթաներ առաջացնելու ունակությամբ: Նրանց կողմից առաջացրած գաղութները նույնպես տարբերվում են ինչպես տեսքով ու գույնով, այնպես էլ չափսերով: Բոլոր գաղութները ունեն հարթ եզրեր և բաժանվում են 5 հիմնական խմբերի՝ սպիտակ փոքր 0.5 – 1.3 մմ, սպիտակ միջին 1.0 - 1.5, թափանցիկ փոքր 1.0 – 1.2, կաթնագույն մանր 0.5 – 1.5 մմ և կաթնագույն խոշոր 1.5 – 1.8 մմ տրամագծերով տարբեր կոկային շտամներ:

Աղյուսակ 14

Լակտոկոկերի մորֆոմետրիկ հատկանիշները և կաթի ֆերմենտացիան

ԼԿ շտամ	Գաղութների մորֆոլոգիա		Բջիջների մորֆոլոգիան		Կաթի ֆերմենտացիան
	Տեսքը	Չափսեր ը, մմ	Տեսքը	Չափսեր ը, մկմ	
LH1	Սպիտակ, փոքր	1.0-1.2	Կոկեր, կարճ շղթաներ	0.5 – 1.5	++

LH4	Սպիտակ, փոքր	1.0-1.3	Կոկեր, կարճ շղթաներ	1.0 – 1.2	++
LH8	Սպիտակ, միջին	1.0-1.5	Կոկեր, կարճ շղթաներ	1.0 – 1.3	++
LH16	Սպիտակ, միջին	1.0-1.5	Դիպլոկոկեր, կոկերի կարճ շղթաներ	1.0 – 1.5	++
LH21	Սպիտակ, միջին	1.0-1.5	Դիպլոկոկեր, կոկերի կարճ շղթաներ	1.0 – 1.5	++
LH24	Սպիտակ, միջին	1.0-1.5	Դիպլոկոկեր, կոկերի կարճ շղթաներ	1.0 - 1.2	+++
LH34	Կաթնագույն, մանր	1.0 -1.2	Կոկերի երկար շղթաներ	1.5 – 1.8	++
LH35	Թափանցիկ փոքր	1.0 -1.2	Դիպլոկոկեր, կոկերի կարճ շղթաներ	1.2 – 1.5	++
LH38	Կաթնագույն, մանր	0.5 – 1.2	Կոկերի կարճ շղթաներ	0.5 – 1.5	+++
LH42	Կաթնագույն, մանր	1.0 -1.2	Կոկերի կարճ շղթաներ	1.0 – 1.5	++
LH43	Կաթնագույն, խոշոր	1.5 – 1.8	Դիպլոկոկեր, կոկերի երկար շղթաներ	1.0 - 1.2	++
LH44	Սպիտակ, փոքր	1.5 – 1.8	Դիպլոկոկեր, կոկերի երկար շղթաներ	0.5 – 1.5	+++

Անջատված բոլոր լակտոկոկերը մոնոկոկուլ տուրայով ընդունակ են ֆերմենտացնել ու կաթը, սակայն կաթի մակարդման արագությամբ և մակարդուկների թանձրությամբ զիջում են լակտոբացիլներին:

3.3.2. Լակտոկոկերի ֆիզիոլոգիական և կուլտուրալ հատկությունները

Ուսումնասիրվել է L4-ային շտամների աճը MRS միջավայրում ջերմաստիճանների 10 - 50°C տիրույթներում, կայունությամբ NaCl

- ի 4.0 և 6.5 - ի, pH-ի 2 – 9.2 - ի պայմաններում: Ինչպես նաև
 լակտոկոկերի աճը ուսումնասիրվել է 2% - 4 % լեղի և 0.1% մեթիլ
 կապույտ պարունակող կաթնային միջավայրերում: Լակտոկոկերի
 դեպքում վերը նշված բոլոր հատկությունները կարևոր
 նշանակություն ունեն տեսակային նույնականացման համար:
 Ուսումնասիրությունների արդյունքները ներկայացված են Աղ. 15-
 ում:

Աղյուսակ 15

*Լակտոկոկերի աճը և կայունությունը միջավայրի տարբեր
 պայմաններում*

ԼԿ շտամ	Աճը տարբեր °C-ում			Աճը NaCl, %		Աճը pH-ում		Լեղիով կաթում %		0.1% ՄԿ կաթում
	10	45	50	4.0	6.5	2	9.2	2	4	
LH1	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
LH4	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
LH8	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
LH16	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-
LH21	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
LH24	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-

Աղյուսակ 15-ի շարունակությունը

LH34	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-
LH35	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LH38	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+

LH42	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
LH43	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LH44	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

ՄԿ- մեթիլ են կապույտ

Ինչպես երևում է ներկայացված տվյալներից, 10⁰C-ում աճում են բոլոր շտամները բացի երկուսից՝ LH35, LH43, 45⁰C-ում աճում են բոլորը, բացի 4-ից՝ LH1, LH8, LH34, LH38, իսկ 50⁰C աճում են միայն երեք շտամ՝ LH35, LH43, LH44: Բոլոր լակտոկոկային շտամները, բացի մեկից LH34, կայուն են 4% NaCl - ի նկատմամբ, pH 2-ում աճում են բոլորը բացի մեկ շտամից՝ LH16 և pH 9.2-ում աճում են բոլորը բացի 2 շտամից՝ LH16 և LH34, 2% և 4% լեղու նկատմամբ կայուն են բոլոր լակտոկոկային շտամները, 6.5% NaCl-ի միջավայրում չեն աճում 2 շտամ՝ LH16, LH21, իսկ 0.1% մեթիլ են կապույտ պարունակող կաթում աճում են 7 լակտոկոկային շտամ՝ LH1, LH4, LH8, LH21, LH38, LH42, LH44: Ստացված տվյալները վկայում են անջատված լակտոկերի բազմազանության և ֆիզիոլոգիո - կենսաքիմիական յուրահատկությունների մասին:

3.3.3. Լակտոկոկերի կառավարչային, օքսիդազային ակտիվությունները, արգինինից ամոնիակի առաջացումը և Գրամով ներկումը

Ուսումնասիրվել է լակտոկոկերի կառավարչային, օքսիդազային ակտիվությունները, արգինինից ամոնիակ առաջացնելու ընդունակությունը, ինչպես նաև ներկումը ըստ Գրամի (Աղ. 16):

Աղյուսակ 16

Լակտոկոկերի կառավարչային, օքսիդազային ակտիվությունները և արգինինից ամոնիակի առաջացումը

Լ Կ շ տամ	Կատալ ազայ ին ակտիվություն	Օքսիդազայ ին ակտիվություն	Արգինինից NH3 առաջացում	Գրամի ներկում
LH1	-	-	+	+
LH4	-	-	+	+
LH8	-	-	+	+
LH16	-	-	+	+
LH21	-	-	-	+
LH24	-	-	+	+
LH34	-	-	-	+
LH35	-	-	-	+
LH38	-	-	+	+
LH42	-	-	+	+
LH43	-	-	+	+
LH44	-	-	+	+

Ինչպես երևում է աղյուսակ 16-ից լակտոկոկային բոլոր շտամները կատալազա և օքսիդազա բացասական են: Երեք լակտոկոկային շտամները՝ LH21, LH34, LH35 արգինինից ամոնիակ չեն առաջացնում:

3.3.4. Լակտոկոկերի կաթի մակարդման արագությունը և մակարդուկների տիտրացվող թթվայնությունը

Ուսումնասիրվել են նաև լակտոկոկերի կողմից կաթի մակարդման արագությունը և մակարդուկի թթվայնությունը (Աղ. 17):

Աղյուսակ 17

Լակտոկոկերի կողմից կաթի մակարդման արագությունը և մակարդի տիտրացվող թթվայնությունը, ըստ թյոքների (°T)

ԿԹԲ 2 տամ	Ժամ					°T
	5	6	7	8	24	
LH1	-	-	-	-	+	87±5
LH4	-	-	-	-	+	82±5
LH8	-	-	-	-	+	80±5
LH16	-	-	-	-	+	94±5
LH21	-	-	-	-	+	96±10
LH24	-	-	-	+	+	98±5
LH34	-	-	-	-	+	86±5
LH35	-	-	-	-	+	85±5
LH38	-	-	-	+	+	100±5
LH42	-	-	-	-	+	90±10
LH43	-	-	-	-	+	95±5
LH44	-	-	-	+	+	102±10

Ինչպես երևում է աղյուսակից, Լակտոկոկային 3 շտամներ կաթը ֆերմենտացնում են ութ ժամում, իսկ մնացած շտամները 24 ժամում, մակարդուկների կոնստիտուցիան և թթվայնությունը ավելի թույլ է համեմատած Լակտոբացիլային շտամների: Տիտրացվող թթվայնության ստորին շեմը կազմում է 80 - 90 °T, իսկ վերինը հասնում է մինչև 94 – 102 °T-ի:

3.3.5. Լակտոկոկերի ածխաջրերի յուրացման պրոֆիլը

Որոշվել է անջատված Լակտոկոկերի կողմից ածխաջրերի յուրացումը 10 տարբեր շաքարներով (Աղ. 18):

Աղյուսակ 18

Լակտոկոկերի ածխաջրերի յուրացման պրոֆիլը

ԿԹԲ	Ռաֆինոզ	Լակտոզ	Տրեգալոզ	Սորբիտ	Արաբինոզ	Գալակտոզ	Մալտոզ	Մելիբիոզ	Մելիզիտոզ	Ռիբոզ
LH1	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+
LH4	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+
LH8	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
LH16	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
LH21	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-
LH24	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-
LH34	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
LH35	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
LH38	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+
LH42	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+
LH43	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+
LH44	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-

Աղյուսակ 18-ի տվյալներից երևում է, որ լակտոզ յուրացնում են բոլոր կոկերը, ռաֆինոզ և արաբինոզ յուրացնում մեկական շտամ, տրեգալոզ չեն յուրացնում երեք, գալակտոզ երկու, մալտոզ մեկ, ռիբոզ չորս շտամ: Մելիզիտոզ և մելիբիոզ յուրացնում են 6-ական, իսկ սորբիտ 2 շտամ:

3.3.6. Լակտոկոկերի աճը էքստրեմալ ջերմաստիճաններում

Ուսումնասիրվել է նաև բարձր և ցածր ջերմաստիճանի ազդեցությանը լակտոկոկերի կենսունակության վրա (Աղ. 19):

Աղյուսակ 19

Կոկերի աճը Էքստրեմալ ջերմաստիճաններում

ԿԹԲ Շտամ	Աճը Էքստրեմալ ջերմաստիճաններում, °C			
	4	50	55	60
LH1	+	-	-	-
LH4	+	_*	-	-
LH8	+	-	-	-
LH16	-	-	-	-
LH21	+	+	-	-
LH24	-	_*	-	-
LH34	-	-	-	-
LH35	-	+	-	-
LH38	-	_*	-	-
LH42	+	-	-	-
LH43	-	-	-	-
LH44	-	+	-	-

**Շտամները 37°C -ի տակ տեղափոխել իս աճում են*

Փորձը ցույց տվեց (Աղ. 19), որ 4°C -ում աճում են հինգ, իսկ 50°C -ում երեք կոկային շտամ, 55°C -ից բարձր ջերմաստիճանում ոչ մի շտամ չի աճում: Աստղանիշով նշված շտամները 37°C տեղափոխել ու դեպքում աճը շարունակվում է, որը վկայում է տվյալ ջերմաստիճանը բակտերիոստատիկ է նշված շտամների համար: Մնացած շտամների համար բարձր ջերմաստիճանը բակտերիոսպան է, քանի որ 37°C տեղափոխման դեպքում չեն աճում:

3.3.7. Անջատված Լակտոկոկերի մետաբոլիկ հատկությունների վերլուծությունը և նույնականացումն ըստԲերջիի որոշիչի

Աղյուսակներ 14 – 19-ում ներկայացված տվյալների վերլուծության հիման վրա կատարվել է կոկային շտամների նույնականացումն ըստԲերջիի բակտերիաների որոշիչի (Աղ. 20):

Աղյուսակ 20

Լակտոկոկերի տեսակները ըստԲերջիի որոշիչի

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. 20 -ից մայրական կաթից անջատված է 12 կոկային շտամներից վեցը պատկանում են *Lactococcus lactis*, մյուս չորսը *Streptococcus thermophilus*, մեկ շտամ *Lactococcus cremoris* և մեկը՝ *Lactococcus raffinolactis* տեսակներին:

3.4. Անջատված շտամների արոբիոտիկ հատկությունները

3.4.1. Լակտոբացիլների հակամանրէային ակտիվությունը

Անջատված լակտոբացիլային շտամների գիշերային կուլտուրաների վերնստվածքային հեղուկների հակամանրէային ակտիվությունն ուսումնասիրվել է *E. coli*, *C. albicans* և *S. aureus* ախտածին թեստ շտամների հանդեպ (Աղ. 21):

Աղյուսակ 21

Լակտոբացիլների հակամանրէային ակտիվությունը

ԼՔ շտամներ	Վերնստվածքային հեղուկով թեստ կուլտուրաների ճնշման գոտիները, մմ		
	<i>E.coli</i> MDC 5003	<i>S. aureus</i> MDC 5233	<i>C. albicans</i> MDC 8013
<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

Լակտոբացիլների մեծ մասի մոտ արտահայտված է հակամանրէային հատկությունները բոլոր երեք թեստ շտամների նկատմամբ (± 0.5): Առավել բարձր հակամանրէային ակտիվությամբ օժտված են *L. fermentum* LH15, *L. casei* LH25, *L. casei* LH26, *L. casei* LH28, *L. reuteri* LH32 շտամները:

3.4.2. Լակտոբացիլների պրոտեոլիտիկ հատկությունները

Կաթում կաթնաթթվային բակտերիաների բազմացման համար անհրաժեշտ են ամինոթթուներ, որոնց աղբյուր են հանդիսանում կաթի կազեինը: ԿԹԲ-ների պրոտեոլիտիկ ակտիվությամբ է պայմանավորված նրանց կողմից կաթի մակարդման արդյունավետությունը: Այն իր հերթին նպաստում է կովի կաթի սպիտակուցների յուրացմանը և ալերգիկ ազդեցությունների նվազեցմանը: Պրոտեոլիտիկ ակտիվությամբ օժտված շտամների առկայությունը կրծքի կաթում հանդիսանում է մանկան կողմից մայրական կաթի, ինչպես նաև հետագայում մանկական կաթնային խառնուրդների յուրացման գրավականը:

Պրոտեոլիտիկ ակտիվությունը ուսումնասիրվել է կաթի հիմքով պատրաստած Էյկմանի միջավայրի վրա տեղադրված ԼԲ-ների գիշերային կուլտուրաների վերնստվածքային հեղուկներով թաթախված թղթե սկավառակների շուրջ կազեինների պրոտեոլիզի արդյունքում առաջացած թափանցիկ գոտիների գոյացումով, որը վկայում է նրանց պրոտեոլիտիկ ակտիվության մասին (Աղ. 22):

Աղյուսակ 22

Լակտոբացիլների պրոտեոլիտիկ ակտիվությունը

ԼԲ շտամներ	Թափանցիկ գոտիները, մմ
<i>L. casei</i> LH25 , <i>L. casei</i> LH26, <i>L. salivarius</i> LH27	11-20
<i>L. delbrueckii</i> LH14, <i>L. fermentum</i> LH15, <i>L. casei</i> LH28, <i>L. casei</i> LH29, <i>L. reuteri</i> LH32	22-27

Ուսումնասիրությունների արդյունքում պարզվեց, որ ԼԲ-ներից շատերը օժտված են արտահայտված պրոտեոլիտիկ

ակտիվությունը (± 0.5), *L. delbrueckii* LH14, *L. fermentum* LH15, *L. casei* LH28, *L. casei* LH29, *L. reuteri* LH32 շտամների կողմից էյկմանի միջավայրի վրա պրոտեոլիզի արդյունքում առաջացրած թափանցիկ գոտիների տրամագիծը կազմել է 22 - 27 մմ, մյուսների մոտեղել է 11 – 20 մմ:

3.4.3. Լակտոբացիլների կայունությունը հակաբիոտիկների հանդեպ

Հակաբիոտիկների հանդեպ կայունությունը պրոբիոտիկների կարևոր հատկանիշներից է, որով որոշվում է նրանց կայունությունը ադեստամոքսային համակարգում երկարատև հակաբիոտիկային թերապիայի կիրառման հանդեպ: Այն որոշվել է հակաբիոտիկների հայտնի խտություններով ներծծված սկավառակների միջոցով (Աղ. 23):

Ստուգված հակաբիոտիկներից շատերի հանդեպ ԼԲ-ների ճնշող մեծամասնությունը բարձր կայունություն է ցուցաբերել (± 0.5): Ստրեպտոմիցինի նկատմամբ առավել կայուն են բոլոր շտամները բացի 2-ից: Երիթրոմիցինի հանդեպ բոլոր ԼԲ-ները եղել են զգայուն, բացի *L. delbrueckii* LH14-ից, որը ցուցաբերել է բարձր կայունություն, ճնշման գոտին կազմել է ընդամենը 8մմ: Կլինդամիցինի նկատմամբ միջին կայունություն է ցուցաբերում *L. delbrueckii* LH14 և *L. fermentum* LH15 շտամները, ճնշման գոտին հասնում է 10մմ-ի: Ռիֆամպիցինի նկատմամբ կայուն է *L. salivarius* LH27 շտամը, իսկ *L. casei* LH25 և *L. casei* LH26 շտամները միջին կայունություն են ցուցաբերում, ճնշման գոտիները հասնում է 10 - 11մմ: Վանկոմիցինի նկատմամբ կայունություն են ցուցաբերում 5, իսկ միջին կայունություն *L. delbrueckii* LH14 և *L. fermentum* LH15 շտամները: Ցիպրոֆլոքսացինի նկատմամբ կայուն են բոլոր շտամները, բացի երկուսից:

Աղյուսակ 23

Հակաբիոտիկներով և ակտոբացիլների աճի ճնշման գոտիները, մմ

Հակաբիոտիկ, մկգ	<i>L. delbrueckii</i> LH14	<i>L. fermentum</i> LH15	<i>L. casei</i> LH25	<i>L. casei</i> LH26	<i>L. salivarius</i> LH27	<i>L. casei</i> LH28	<i>L. casei</i> LH29	<i>L. reuteri</i> LH32
Ստրեպտոմիցին, 30	9	10	8	6*	6*	20	9	11
Էրիթրոմիցին, 15	8	25	22	25	18	25	22	25
Կլինդամիցին, 2	10	10	16	13	15	20	25	26
Ռիֆամպին, 5	15	13	11	10	6*	22	20	18
Վանկոմիցին, 3	10	10	6*	6*	6*	19	6*	6*
Ցիպրոֆլոքսացին, 5	8	11	9	9	9	23	17	10

*6մմ - սկավառակի տրամագիծը

3.4.4. Լակտոկոկերի հակամանրէային ակտիվութիւնը

Անջատված Լակտոկոկային շտամների գիշերային կուլտուրաների վերնստվածքային հեղուկների հակամանրէային ակտիվութիւնն ուսումնասիրվել է *E.coli* MDC 5003, *C. albicans* MDC 8013 և *S. aureus* MDC 5233 պատածին թեստ շտամների հանդեպ (Աղ. 24):

Աղյուսակ 24

Լակտոկոկերի հակամանրէային ակտիվութիւնը

ԼԿ շտամներ	Վերնստվածքային հեղուկով ճնշման գոտիները, մմ		
	<i>E.coli</i> MDC 5003	<i>S. aureus</i> MDC 5233	<i>C. albicans</i> MDC 8013

<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> H44	14-25	15-27	11-20

Ինչպես երևում է աղյուսակի տվյալներից լակտոկոկերի մեծամասնությունն ունեն արտահայտված հակամանրէային ակտիվություն: Լակտոկոկերի մեծ մասի մոտ արտահայտված են հակամանրէային հատկությունները երեք թեստ շտամների նկատմամբ (± 0.5): Առավել բարձր հակամանրէային ակտիվությամբ օժտված են *L. raffinolactis* LH16, *L. lactis* LH21, *L.lactis* LH38, *S.thermophilus* LH43, *S. thermophilus* H44 շտամներն, իսկ թույլ ակտիվություն ցուցաբերում են *L. lactis* LH1, *L. lactis* LH4 և *S. thermophilus* LH24 շտամները:

3.4.5. Լակտոկոկերի պրոտեոլիտիկ ակտիվությունը

Ուսումնասիրվել է նաև մայրական կաթից մեկուսացված լակտոկոկային շտամների պրոտեոլիտիկ ակտիվությունը կաթի հիմքով պատրաստած էյկմանի ագարային միջավայրի վրա գիշերային կուլտուրաների վերնստվածքային հեղուկներով թաթախված թղթե սկավառակներով ինկուբացիայից հետո նրանց շուրջ առաջացած թափանցիկ գոտիների չափերով: ԼԿ-երի պրոտեոլիտիկ ակտիվության վերաբերյալ տվյալները ներկայացված են Աղ. 25-ում:

Աղյուսակ 25

Լակտոկոկերի պրոտեոլիտիկ ակտիվությունը

ԼԿ շտամներ	Թափանցիկ գոտիները, մմ
------------	-----------------------

<i>L. lactis</i> LH1, <i>L. lactis</i> LH21, <i>S. thermophilus</i> LH24, <i>L. lactis</i> LH42	14-21
<i>L. lactis</i> LH4, <i>L. lactis</i> LH8, <i>L. raffinolactis</i> LH16, <i>L. cremoris</i> LH34, <i>S. thermophilus</i> LH35, <i>L. lactis</i> LH38, <i>S. thermophilus</i> LH43, <i>S. thermophilus</i> LH44	20-23

Ուսումնասիրությամբ ուսնների արդյունքում պարզվեց, որ մայրական կաթից անջատված ԼԿ-երը ունեն արտահայտված պրոտեոլիտիկ ակտիվություն: Առավել ակտիվությամբ 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 (± 0.5): ԼԿ-երը իրենց առավելագույն պրոտեոլիտիկ ակտիվությամբ որոշակիորեն զիջում են լակտոբացիլներին, որովհետև կարելի է բացատրել նրանց կողմից կաթի մակարդման ցածր արագությունը, մակարդուկների ցածր պնդությունը և ցածր տիտրացվող թթվայնությունը:

3.4.6. Լակտոկոկերի կայունությունը հակաբիոտիկների հանդեպ

Կայունությունը հակաբիոտիկների հանդեպ շատ կարևոր պրոբիոտիկ ցուցանիշ է նաև լակտոկոկերի համար: ԼԿ-երի կայունությունը հակաբիոտիկների հանդեպ ներկայացված է Աղ. 26-ում:

Աղյուսակ 26

Հակաբիոտիկներով լակտոկոկերի աճի ճնշման գոտիները, մմ

Հակաբիոտիկ, մկգ	<i>L. lactis</i> LH1	<i>L. lactis</i> LH4	<i>L. lactis</i> LH8	<i>L. raffinolactis</i> LH16	<i>L. lactis</i> LH21	<i>S. thermophilus</i> LH24	<i>L. cremoris</i> LH34	<i>S. thermophilus</i> LH35	<i>L. lactis</i> LH38	<i>L. lactis</i> LH42	<i>S. thermophilus</i> LH43	<i>S. thermophilus</i> LH44
Ստրեպտոմիցին ,30	8	11	6*	13	25	6*	10	20	8	8	6*	8

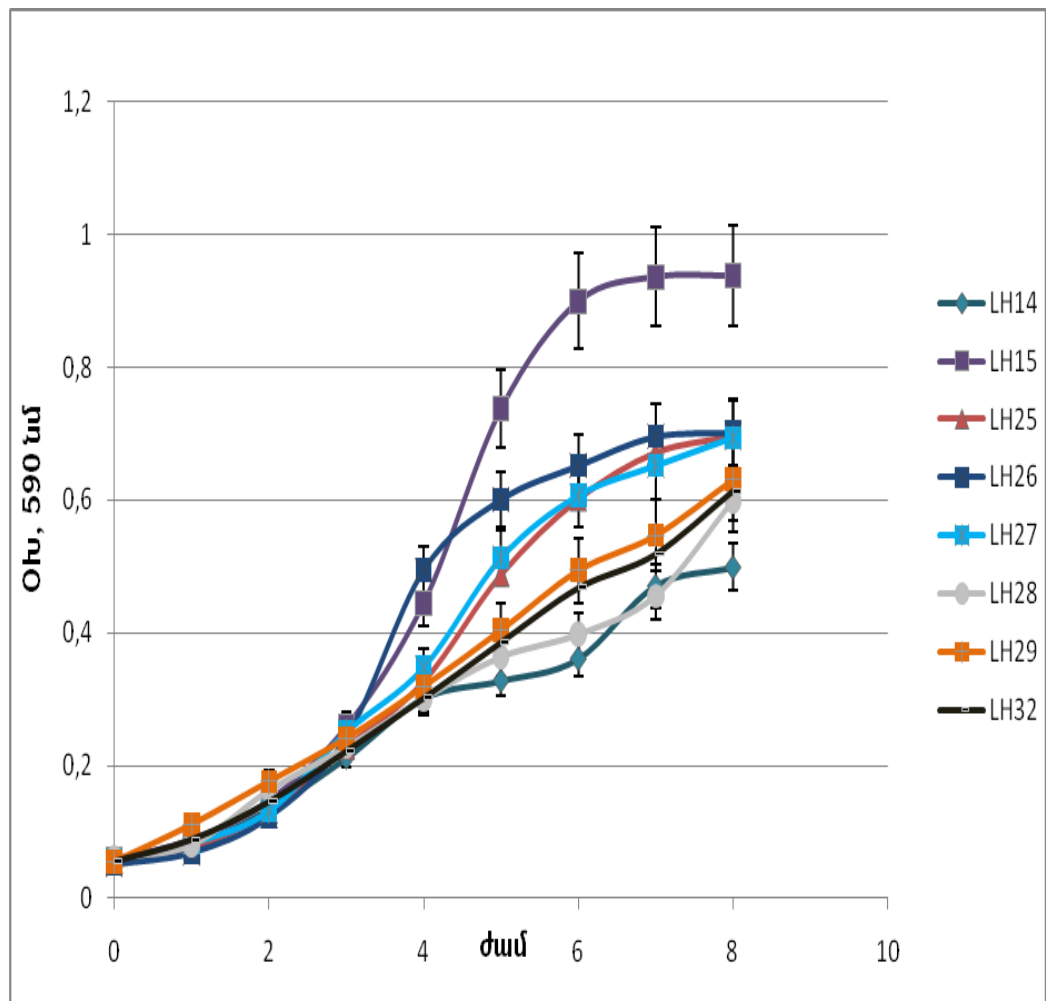
Էրիթրոմիցին,1 5	13	19	8	8	10	16	6*	18	6*	12	13	12
Կլ ինդամիցին,2	6*	15	8	10	21	24	25	22	18	8	6*	10
Ռիֆամպին,5	7	10	6*	12	13	25	21	8	12	13	21	14
Վանկոմիցին,30	22	9	8	8	6*	11	10	23	14	25	8	6*
Ցիպրոֆլոքսացին,5	8	9	10	8	6*	23	12	10	6*	15	12	6*

*6մմ- սկավառակի տրամագիծը

Ինչպես երևում է աղյուսակ 28-ից անտիբիոտիկների նկատմամբ կայունություն են ցուցաբերում կոկերի մեծամասնությունը (± 0.5): Ստրեպտոմիցինի նկատմամբ կայուն են բոլոր կոկերը բացի 2-ից, Էրիթրոմիցինի նկատմամբ 3, կլինդամիցինի՝ 4, ռիֆամպինի և վանկոմիցինի նկատմամբ 3, իսկ ցիպրոֆլոքսացինի նկատմամբ կայուն են բոլոր շտամները բացի մեկից:

3.5. Լակտոբացիլների և լակտոկոկերի աճի կինետիկան, կենսազանգվածի կուտակումը

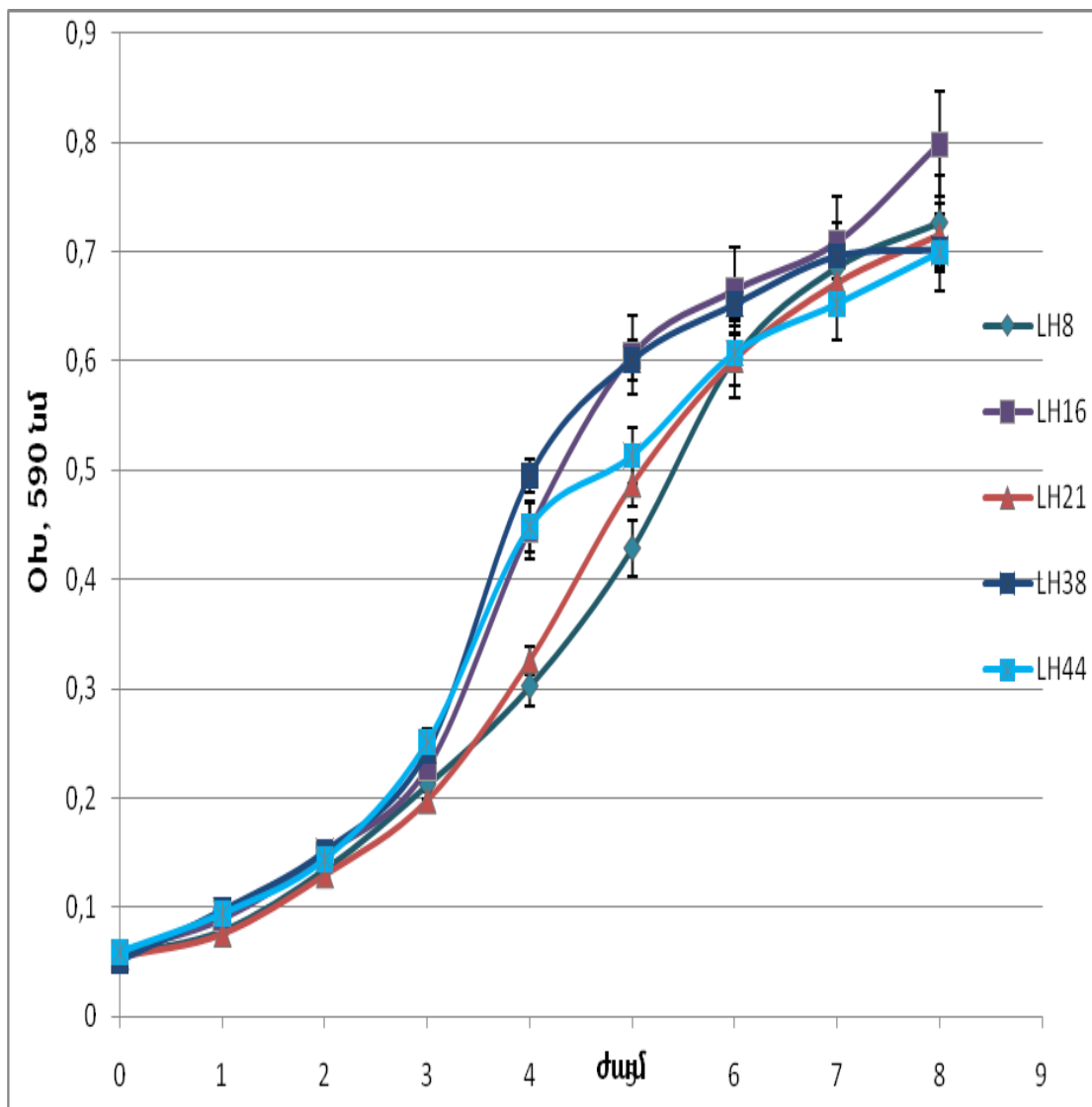
ԿԹԲ-ների աճի բարձր արագությունը մարդու էկոհամակարգերի գաղութացման կարևորագույն գործոններից է: Ուսումնասիրվել է մայրական կաթից անջատված լակտոբացիլների և լակտոկոկերի աճման օրինաչափությունները MRS միջավայրում, ճոճանակավոր ջրային բաղնիքում, 37°C պայմաններում: Այն հնարավորություն է տալիս օգտակար միկրոօրգանիզմներին առավելության հասնել մրցակից ախտածին միկրոօրգանիզմների հանդեպ հասանելի սննդի արագ յուրացման և հակամանրէային նյութերի սինթեզի միջոցով (Նկ. 3, 4):



Նկար 3. *Lակտոբացիլների աճի կինետիկան և կենսազանգավածի կուտակումը MRS միջավայրում*

ՊԲ-ների աճման արագությունը և կենսազանգավածի կուտակումը կարևոր նշանակություն ունի նաև կենսապատրաստուկների արտադրությունում: Նկար 3 - ում ներկայացված կորերից երևում է, որ *L. fermentum* LH15 շտամը տարբերվում է մյուսներից արագ աճով և մեծ կենսազանգավածի կուտակումով: *L. delbrueckii* LH14 շտամը չնայած մեկնարկային արագ աճի ՕԽ 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* LH26, *L. salivarius* LH27 և *L.casei* LH25 շտամները, որոնք ունեն աճի համեմատաբար բարձր արագություն և կենսազանգավածի կուտակում:

Ընտրված հինգ կոկային շտամների աճի օրինաչափությունները MRS արգանակում ներկայացված են նկար 4-ում:

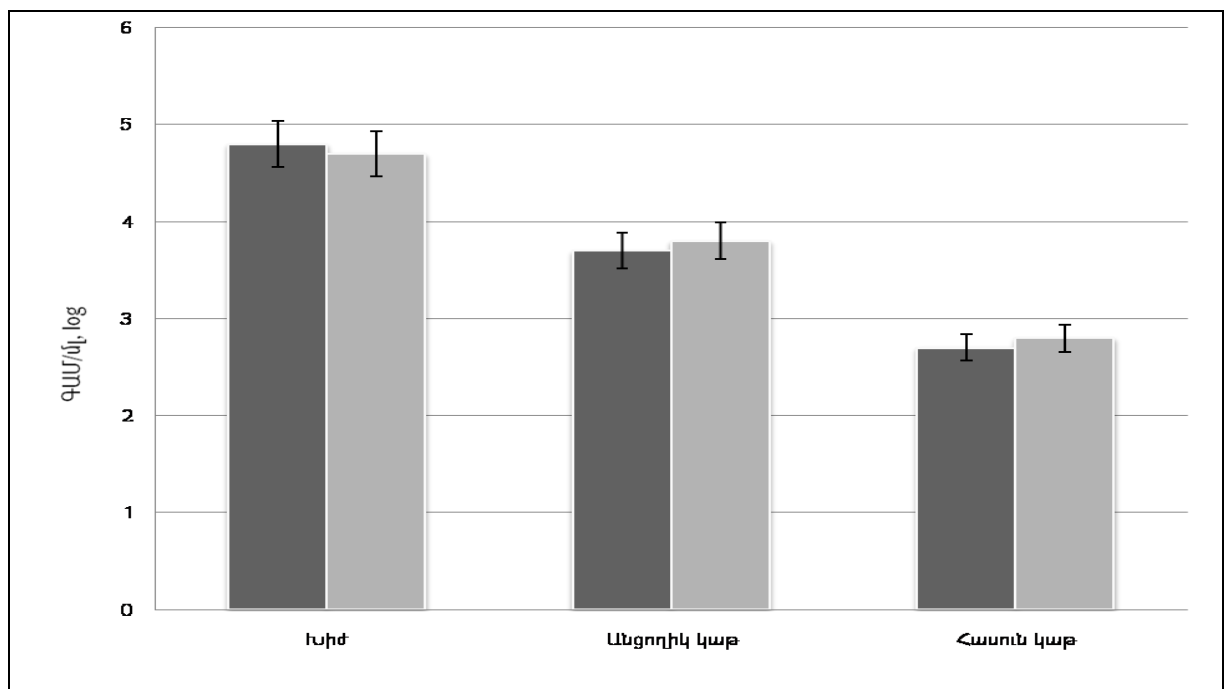


Նկար 4. *Lակտոկոկերի աճի կինետիկան*

Նկ. 4-ի կորերից երևում է, որ ներկայացված բոլոր *լակտոկոկային* շտամներն օժտված են աճի բարձր տեսակարար արագությամբ: Աճի արագության որոշակի տարբերություն դիտվում է 3 - 6 ժամերի տիրույթում: Կենսազանգվածի կուտակման համեմատաբար բարձր մակարդակ նկատվում է *L.raffinolactis* LH16 շտամի մոտ:

3.6. Մայրական կաթի միկրոբիոմայի քանակական տատանումները լակտացիայի տարբեր փուլներում

Ստուգվել է խիժի, անցողիկ և հասուն մայրական կաթի միկրոբային կազմի փոփոխությունները կերակրման ընթացքում: Կուլտիվացվող բակտերիաների ընդհանուր քանակը որոշելու համար կատարվել են տասնանգամյա նոսրացումներ ինչպես խիժից, անցողիկ կաթից, այնպես էլ հասուն կաթից և ինոկուլացվել են MRS ագարային միջավայրում, յուղագերծ կովի կաթում և ինոկուբացվել թերմոստատում 37°C -ի տակ: Նոսրացումներով ֆերմենտացված կաթերի և MRS միջավայրի վրա աճած գաղութների քանակի տվյալները ներկայացված են նկար 5-ում:



Նկար 5. Խիժի, անցողիկ և հասուն կաթում կուլտիվացվող ԿԹԲ-ների քանակությունը MRS ագարի վրա (■) և յուղագերծ կովի կաթում (□)

Մայրական կաթի բակտերիալ տիտրերը որոշված MRS ագարի վրա գաղութների քանակով և ֆերմենտացված կաթի փորձանոթների քանակով էականորեն չեն տարբերվում, որը վկայում է, որ մայրական կաթում գերակշռող են հանդիսանում կաթնաթթվային բակտերիաները: Բացի այդ, MRS ագարի վրա աճած պատահականորեն ուսումնասիրված բոլոր գաղութները ընդունակ են եղել ֆերմենտացնելու կովի կաթը: Համաձայն ստացված արդյունքների

Խիժուժմ և անցումայ ին կաթում մանրէների տիտրը կազմում է մոտ 5×10^4 ԳԱՄ/մլ, որն լակտացիայի ընթացքում աստիճանաբար իջնում է հասնելով հասուն կաթում $(2-5) \times 10^2$ ԳԱՄ/մլ:

3.7. Մայրական կաթում կուլ տիվացվող մանրէների վարքագիծը *in vivo* ուսումնասիրություններում

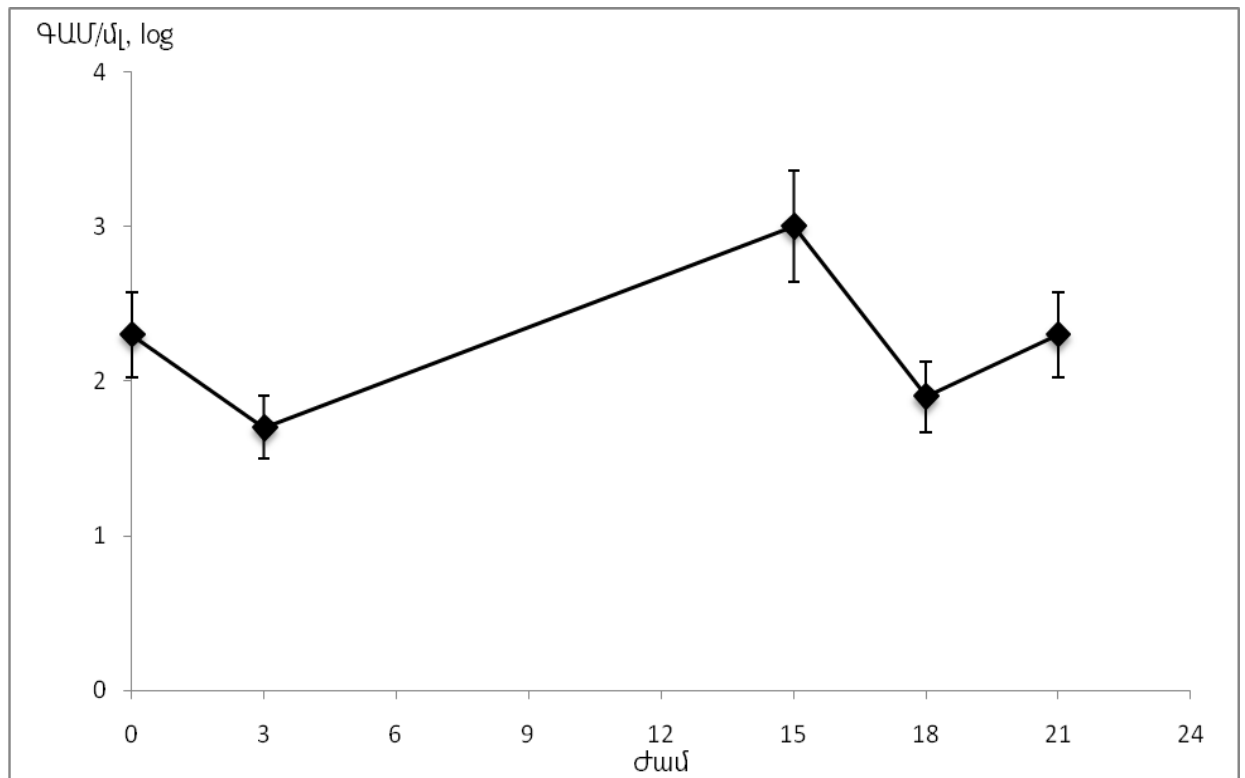
Բազմաթիվ աշխատություններում ներկայացված են հստակ ապացույցներ, որ մայրական կաթը ներառում է բնիկ մանրէներ և հայտնաբերվել են գերակշռող տեսակեր, որոնք փոխանցվում են նորածիններին, սակայն շատ քիչ աշխատանքներ են կատարվել մանրէաբանական կազմի վարքագծի վերաբերյալ *in vivo* պայմաններում:

Մեր կողմից հետազոտվել է կրծքագեղձերում մայրական կաթի ժամանակավոր միկրոբիոտայի քանակական փոփոխությունները կախված կերակրումների միջև ընկած ժամանակահատվածի տևողությունից:

Մայրական կաթի մանրէների քանակը կախված է կնոջ կոնստիտուցիայից, սակայն այն կարող է փոփոխվել կերակրումների ընթացքում: Կերակրումներից-կերակրում միջին տևողությունը կազմում է մոտ երեք ժամ: Մեր կողմից ուսումնասիրվել է կերակրումների միջև տևական ընդմիջումների ազդեցությունը կրծքում միկրոբների պոպուլյացիայի քանակության վրա: Այդ նպատակով լակտացիայի երկրորդ ամսում գտնվող կնոջը խնդրել ենք մինչև նմուշառումը 12 ժամվա ընթացքում մի կրծքով չկերակրել երեխային: Առաջին նմուշը վերցրել ենք անմիջապես կերակրելուց առաջ, մյուսը կերակրելուց հետո, երրորդ նմուշը՝ 12 ժամյա դադարից հետո, իսկ չորրորդն՝ 3 ժամ անց: Նմուշներից MRS ագարի վրա արված ցանքսերից առաջացած գաղութների հաշվարկների հիման որոշված բակտերիալ տիտրերը ներկայացված է (նկ.6 - ում):

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 միկրոբների տիտրը

բարձրանում է նորից տասն անգամ, կազմելով մոտավորապես 10^3 ԳԱՄ/մլ :

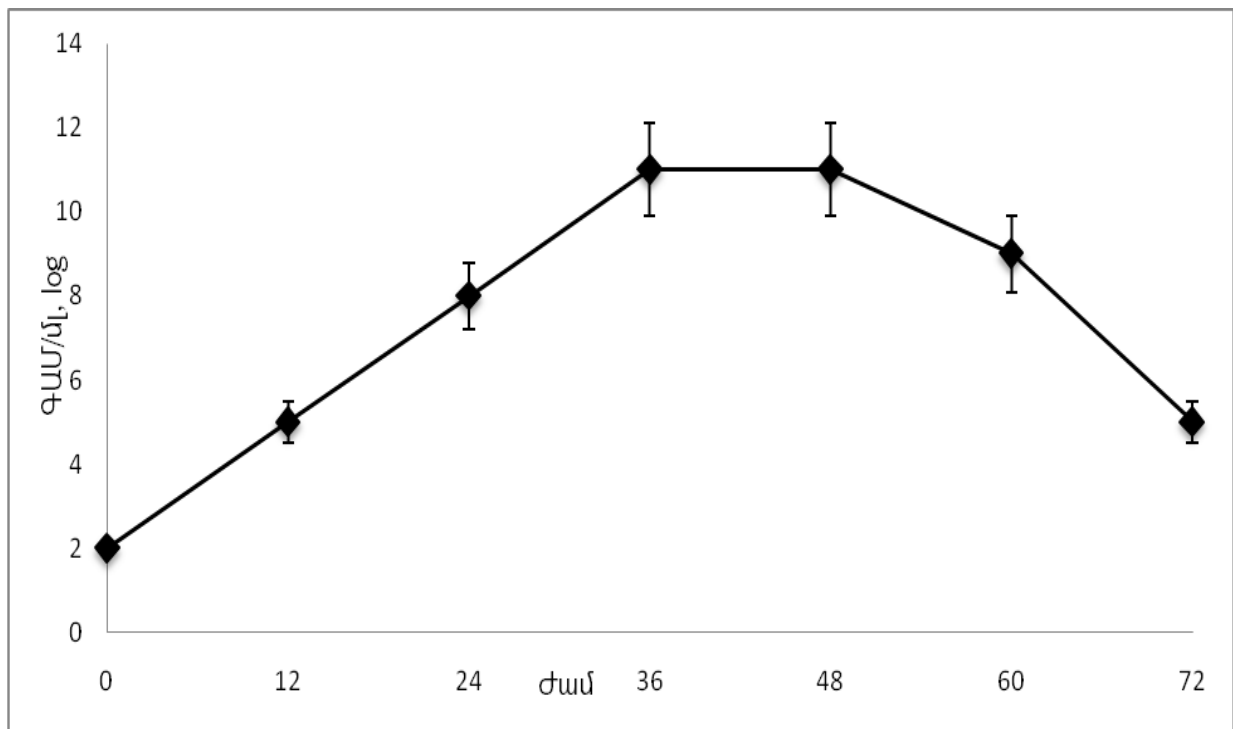


Նկար 6. Մայրական կաթի միկրոբների քանակական փոփոխությունները կրծքում, կախված կերակրումների միջև ընկած ժամանակահատվածից

Կերակրման երկար ընդմիջման ազդեցությունը կրծքում մանրէների կուտակման վրա ակնհայտ է, սակայն այն սահմանափակ է՝ 12 ժամում սննդանյութերով հարուստ միջավայրում այն մեծանում է ընդամենը 1 log –ով: Պատճառը պարզելու նպատակով մեր կողմից ուսումնասիրվեց կրծքի կաթի կոմենսալ մանրէների աճը *ex vivo* պայմաններում:

3.8. Մայրական կաթի բնիկ մանրէների աճը *ex vivo*, 37 °C

Թարմ մայրական կաթի նմուշներում որոշվել է առկա կուլտիվացվող մանրէների քանակը և տեղադրվել է թերմոստատ 37 °C, ստացիոնար պայմաններում: Այնուհետև, 12 ժամ ընդմիջումներով երեք օրերի ընթացքում որոշվել է մանրէների քանակը տասնապատիկ նոսրացումների ցանքսով MRS-ազարի վրա և մանրէազերծ կովի կաթում ինոկուլացման միջոցով (Նկ. 7):



Նկար 7. Մանրէների քանակական փոփոխությունները ex vivo բնական մայրական կաթում, 37 °C – ում ինկուբացիայի ընթացքում

Ինչպես երևում է աճման կորերից, կրծքի կաթում մանրէների նախնական քանակը եղել է 2.5×10^2 ՓԱՄ/մլ, ինկուբացիայի հաջորդող 36 ժամերի ընթացքում տեղի է ունեցել ռեգիդենտ մանրէների էքսպոնենցիալ բնույթի ինտենսիվ աճ, որի արդյունքում նրանց տիտրը հասել է առավելագույնի 3.5×10^{11} ՓԱՄ/մլ: Հետագա, 12 ժամ տևած ստացիոնար փուլին հաջորդող 24 ժամերի ընթացքում մանրէների տիտրը հետզհետե նվազել է մոտ 7 log –ով: Նմանատիպ արդյունքներ ստացվել են յուղագերծ կովի կաթում տիտրացման եղանակով արված փորձերում: Կարևոր է նշել, աճման տարբեր փուլերից վերցված բոլոր նմուշները մերում են կովի կաթը, այն դեպքում երբ ամբողջ կուլտիվացման ընթացքում մայրական կաթը չի մակարդվում:

Ex vivo կուլտուրաների աճի ուշ լոգարիթմական փուլից սելեկտիվ ազարային միջավայրի վրա արված ցանքսերից աճած գաղութների պատահական եղանակով (ռանդոմ) արված մորֆո - ֆիզիոլոգիական ստուգումների, այնպես էլ կովի կաթի մակարդման տվյալներից կարելի է եզրակացնել, որ մայրական կաթում առկա սննդի յուրացման մրցակցության, ինչպես նաև հակամանրէային

միացույթյունների արտադրության արդյունքում ի վերջո մեկ, առավել հազվադեպ երկու, կաթնաթթվային բակտերիաներ դառնում են գերիշխող:

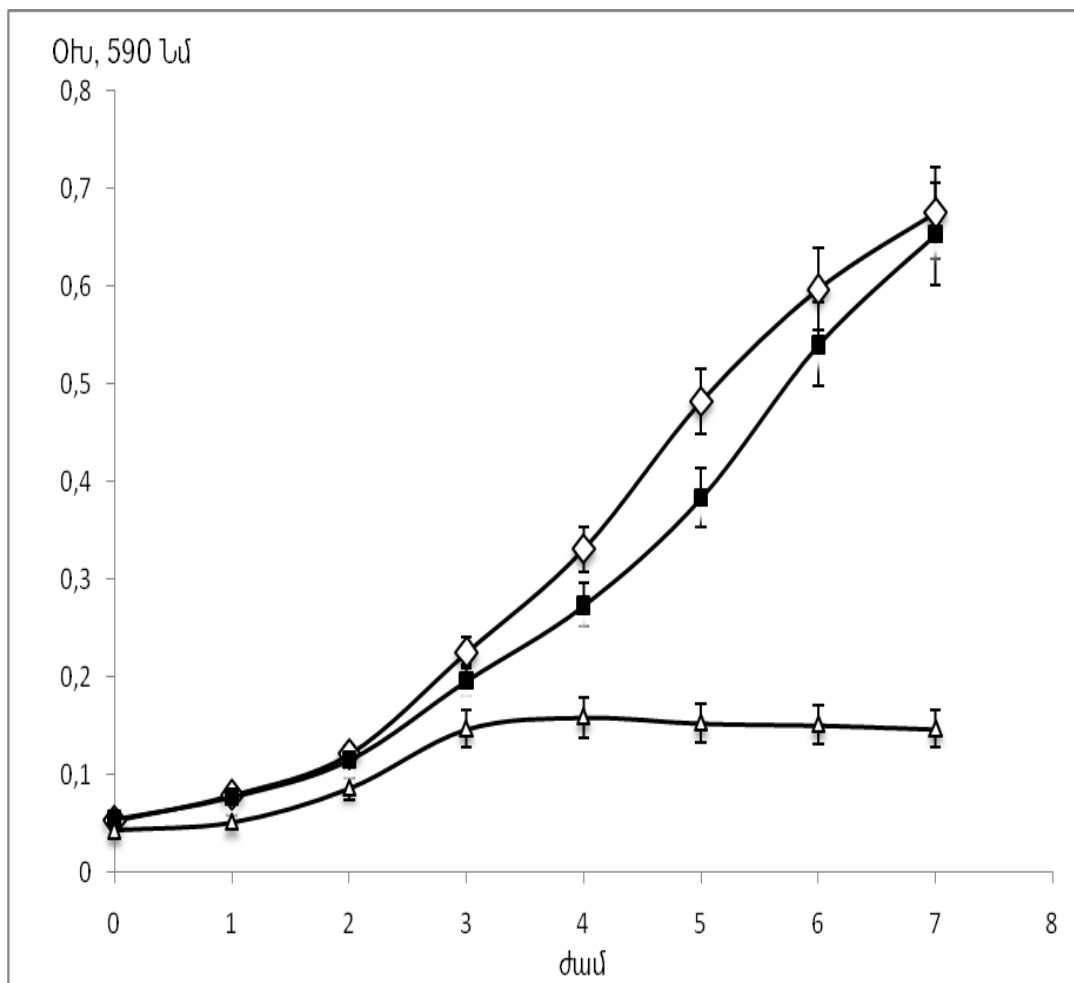
3.9. Սինթետիկ օլիգոշաքարների և բուսական կամեդների յուրացումը և ակտոբակտերիաների կողմից

Ի տարբերություն պրոբիոտիկների, որոնք ընդունելուց հետո աղիներում մրցակցում են աղիքային կոմենսալ միկրոօրգանիզմների կայուն համայնքների դեմ, պրոբիոտիկների օգտագործման առավել ությունը կայանում է աղիների ֆունկցիոնալ փոփոխության մեջ, որտեղ թիրախային բակտերիաները աղիներում արդեն իսկ կոմենսալ են: Արդյունքում, պրոբիոտիկները աղիքային համակարգի վերափոխման համար թերևս ավելի պրակտիկ և արդյունավետ միջոցներ են, քան պրոբիոտիկները: Որպես պրոբիոտիկներ օգտագործվում են սինթետիկ և բնական օլիգոշաքարներ և բազմաշաքարները: Մեր կողմից սինթետիկ օլիգոշաքարներից ուսումնասիրվել է և ակտուել ոգը, որը և այնորեն կիրառվում է աղեստամոքսային հիվանդությունների կանխարգելման և բուժման նպատակով: Սակայն նրա ազդեցությունը մայրական կաթից անջատված մանրեների վրա ուսումնասիրված չէ: Մեր կողմից առաջին անգամ ուսումնասիրվել են բնական բազմաշաքարներից ծիրանենու և սենեգալյան ակացիայի կամեդները, որոնք պրոբիոտիկների նման չեն յուրացվում մարդու աղեստամոքսային համակարգում, բայց կարող են յուրացվել պրոբիոտիկների կողմից: Սենեգալյան ակացիայի կամեդը և այնորեն կիրառվում է որպես սննդային հավելում E414 անվան տակ, սակայն որպես պրոբիոտիկ այն ուսումնասիրված չէ: Չնայած նրան, որ ծիրանենու կամեդը հայտնի է որպես աղեստամոքսային համակարգի հիվանդությունների և թունավորումներ արդյունավետ միջոց, նրա ազդեցության մեխանիզմները աղիքային միկրոբիոտայի վրա դեռևս ուսումնասիրված չէ:

3.9.1. Լակտուլոզի յոլորացումը *L. fermentum* LH15 շտամի կողմից

Լակտուլոզը հայտնի պրեբիոտիկ է, սակայն նրա յոլորացումը մայրական կաթից անջատված բակտերիաների կողմից դեռևս ուսումնասիրված չի եղել:

Նկար 8-ում ներկայացված է *L. fermentum* LH15 շտամի աճի դինամիկան և կենսազանգվածի կուտակումը Լակտուլոզ պարունակող LAPT-M միջավայրում:



Նկար 8. *L.fermentum* LH15 կուլիտուրայի աճի կինետիկան և կենսազանգվածի կուտակումը Լակտուլոզ պարունակող LAPT-M միջավայրում: Ստուգիչներ՝ □-LAPT-M + գլյուկոզ, Δ- LAPT-M առանց հավելման և ■- LAPT-M + Լակտուլոզ

Որպես պրոբիոտիկ ստուգիչ հանդիսացել է LAPT-M միջավայրը գլյուկոզով և նեգատիվ՝ LAPT-M-ը առանց ածխաջրերի հավելման:

Ինչպես երևում է նկ.8 – ում ներկայացված կորերից, *L. fermentum* LH15 շտամը լակտուլոզ պարունակող միջավայրում աճի արագությամբ և կենսազանգվածի կուտակումով չի գիջում գլյուկոզ պարունակող միջավայրին:

Նախկինում ցույց է տրվել, որ կովի կաթում, բարձր ջերմաստիճանի տակ (120 - 130°C) առաջանում է օլիգոշաքար՝ լակտուլոզ, որն ընդունակ է խթանել բիֆիդո և լակտոբակտերիաների աճը [91, 121, 125, 126, 159]: Այժմ լակտուլոզը սինթեզվում է քիմիական եղանակով և լայնորեն օգտագործվում է աղիքային խանգարումների և դիսբակտերիոզների բուժման նպատակով [37, 146, 151, 161, 163, 168]:

Մայրական կաթում նույնպես հայտնաբերվել են լակտուլոզի հատկություններով օժտված, այսպես կոչված բիֆիդոգեն գործոններ, հիմնականում գալակտոօլիգոշաքարներ (ԳՕՇ), որոնք նպաստում են նորածնի մոտ նորմալ միկրոբիոցենոզի գոյացմանը [69, 70]: Վերջինիս հետ կապված շատ կարևոր է ուսումնասիրել լակտուլոզի յուրացման էֆեկտիվությունը մայրական կաթից անջատված կաթնաթթվային բակտերիաների կողմից նրանց մանկական սննդում որպես հավելումներ օգտագործելու, ինչպես նաև կերակրող մայրերի համար սինթետիկներ ստեղծելու նպատակով:

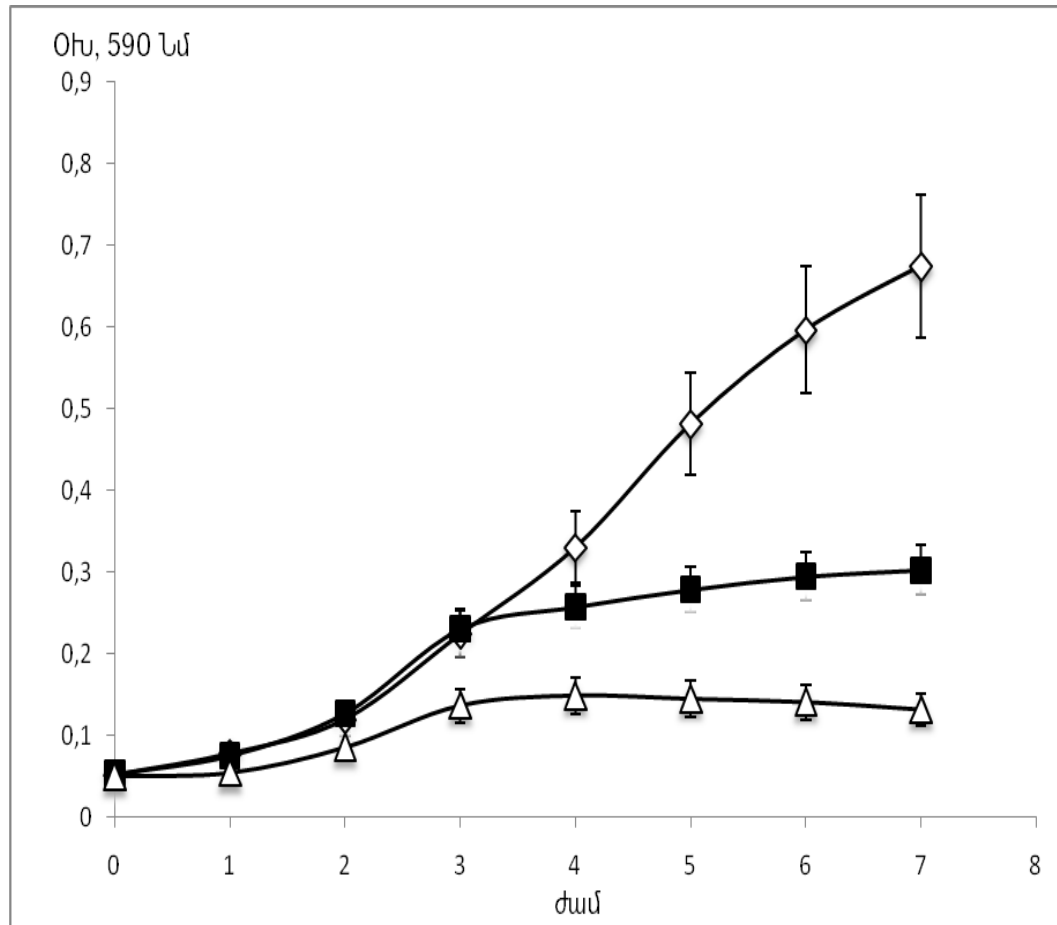
3.9.2. Գումիարաբիկի (սենեգալյան ակացիայի արտազատուկի) յուրացումը *L. fermentum* LH15 շտամի կողմից

Ըստ FAO -ի դասակարգման (1990) սննդի արդյունաբերությունում սենեգալյան ակացիան օգտագործվում է որպես հավելում E414: Այն պարունակում է արաբիկոզ (24–29%), գալակտոզ (36–42%), գլյուկոլոնաթթու (16–17%), ռամնոզ (12–14%), ազոտ (0.327–0.365%) և պրոտեիններ (2.16–2.41%) [138]:

Ուսումնասիրել ենք *L.fermentum* LH15 աճի դինամիկան և կենսազանգվածի կուտակումը LAPTM միջավայրում 1% գումիարաբիկ պարունակող միջավայրում (նկ. 9):

Ինչպես երևում է նկ.9-ի կորերից *L.fermentum* LH15 շտամը կարճ լագ փուլից հետո անցնում է լոգարիթմիկ աճի փուլ և սկսում է

ինտենսիվ աճել 3 ժամ: Շտամի կողմից սենեգալյան ակացիայի բազմաշաքարների՝ արաբինոզի, գալակտոզի, ռամնոզի յուրացումից հետո անցնում է ստացիոնար փուլ:



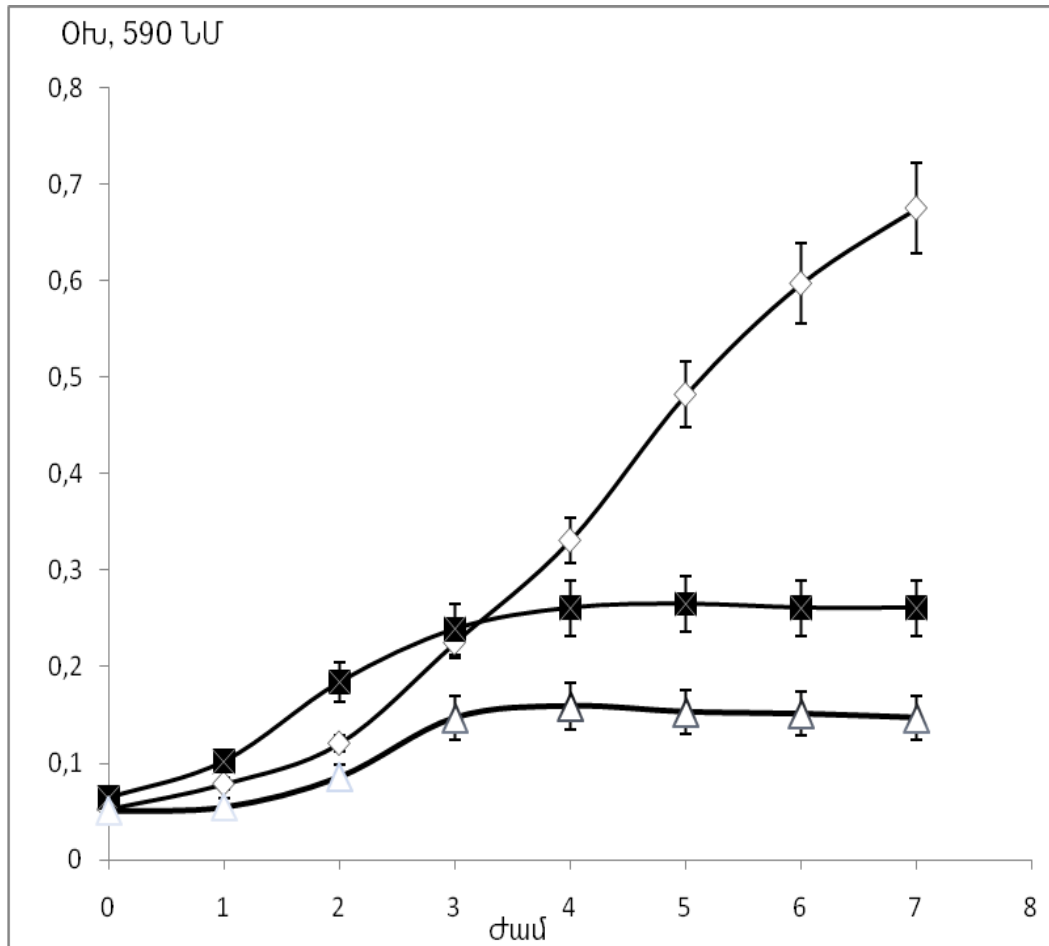
Նկար 9. *L.fermentum* LH15 կոուլտուրայի աճի կինետիկան և կենսազանգվածի կուտակումը 1% գուլմիարաբիկ պարունակող LAPT-M միջավայրում ■- LAPT-M+ գուլմիարաբիկ, ստուգիչներ՝ □-LAPT-M + գլյուկոզ և △- LAPT-M առանց հավելման

Այդ ընթացքում ՕԽ-ի փոփոխությունները չի ունենում մինչև 7 ժամ, երբ առանց գլյուկոզայի միջավայրում սկսած 6 ժամից նկատվում է կենսազանգվածի իջեցման տենդենց:

3.9.3. Ծիրանենու կամեդի յուրացումը *L. fermentum* LH15 շտամի կողմից

Ծիրանենու կամեդը իր ֆիզիկոքիմիական հատկություններով բավականաչափ տարբերվում է սենեգալյան ակացիայի կամեդից: Այն ավելի մածուցիկ է և պարունակում է շուրջ 84 % գլյուկոլորոնային թթու, իսկ արաբինոզն ու գալակտոզը (արաբինազալ ակտան) քսիլոզի և գլյուկոզի հետմիասին կազմում են նրա 17 %:

Ծիրանենու կամեդի *L. fermentum* LH15 շտամի կողմից նույնպես ուսումնասիրվել է LAPT-M միջավայրում, որտեղ որպես ածխածնի հիմնական աղբյուր ավելացվել է 1 % քանակությամբ: ճոճանակային ջրային բաղնիքում 37°C ջերմաստիճանում ածի ընթացքում պարբերաբար չափվել է Օհ-ը (Նկ. 10):

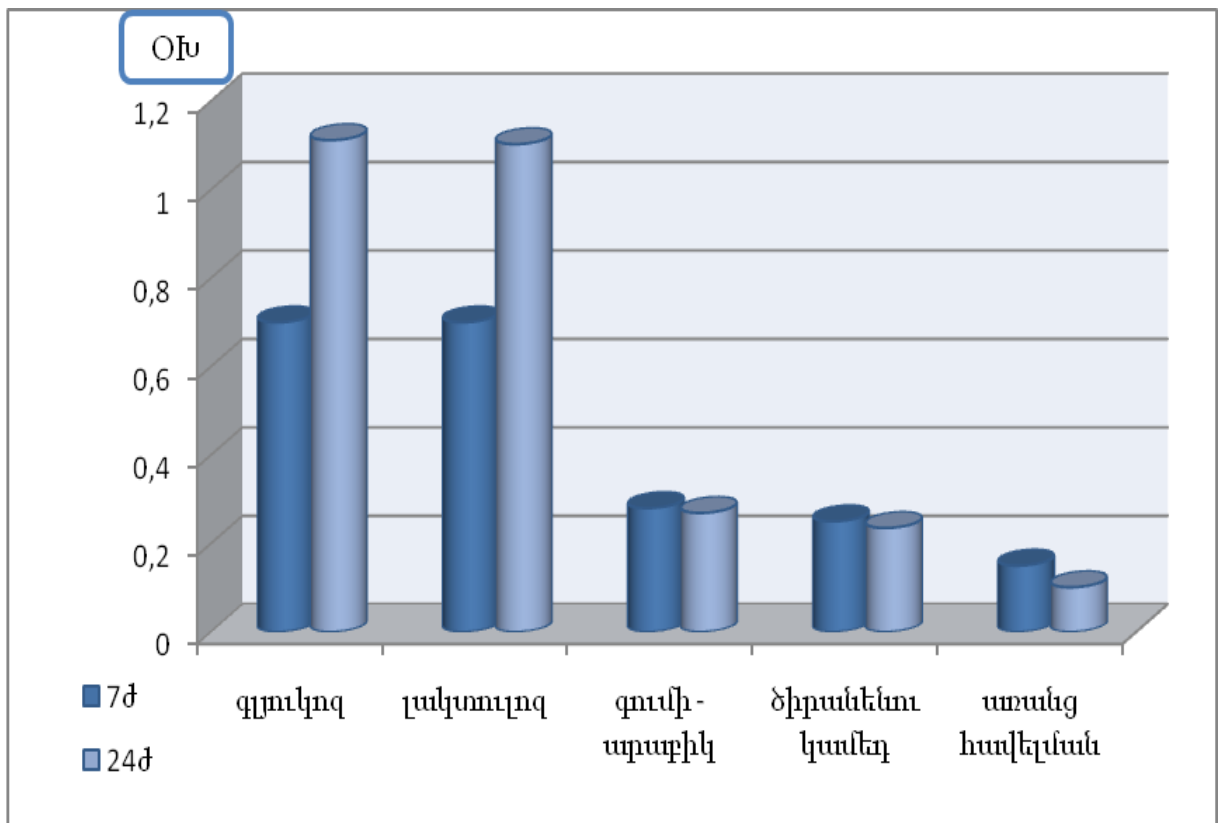


Նկար 10. *L.fermentum* LH15 կուլտուրայի ածի կինետիկան և կենսազանգվածի կուտակումը 1% ծիրանենու կամեդի պարունակող LAPT-M միջավայրում: Ստուգիչներ՝ □-LAPT-M + գլյուկոզ, Δ- LAPT-M առանց հավելման և ■- LAPT-M+ ծիրանենու կամեդի

Ինչպես երևում է Նկ.10-ից *L.fermentum* LH15 շտամը կարճ լագ փուլից հետո անցնում է լոգարիթմիկ աճի փուլ և սկսում ինտենսիվ աճել 3 ժամ: Շտամի կողմից կամեդի դյուրամարս միացությունների յուրացումից հետո անցնում է ստացիոնար փուլ՝ առանց Օհ-ի փոփոխության մինչև 7 ժամ, երբ առանց գլյուկոզային միջավայրում սկսած 6 ժամից նկատվում է կենսազանգվածի իջեցման տենդենց: Կորերի երկկոմպոնենտությունը խոսում է կամեդի կազմի մեջ

մտնող դյուրամարս շաքարների և համարյա չյուրացվող բազմաշաքարների առկայության մասին:

Թափահարիչի վրա յոթ ժամյա աճից հետո բոլոր կուլտուրաները տեղափոխվել են թերմոստատ և ինկուբացիան շարունակվել է մինչև 24 ժամը լրանալը, այնուհետև չափվել են Օհ-ները (Նկ. 11):



Նկար 11. *L.fermentum* LH15 շտամի աճի դինամիկան և կենսազանգվածի կուտակումը ածխածնի տարբեր աղբյուրներ պարունակող LAPTМ միջավայրում 24 ժամ ստացիոնար պայմաններում

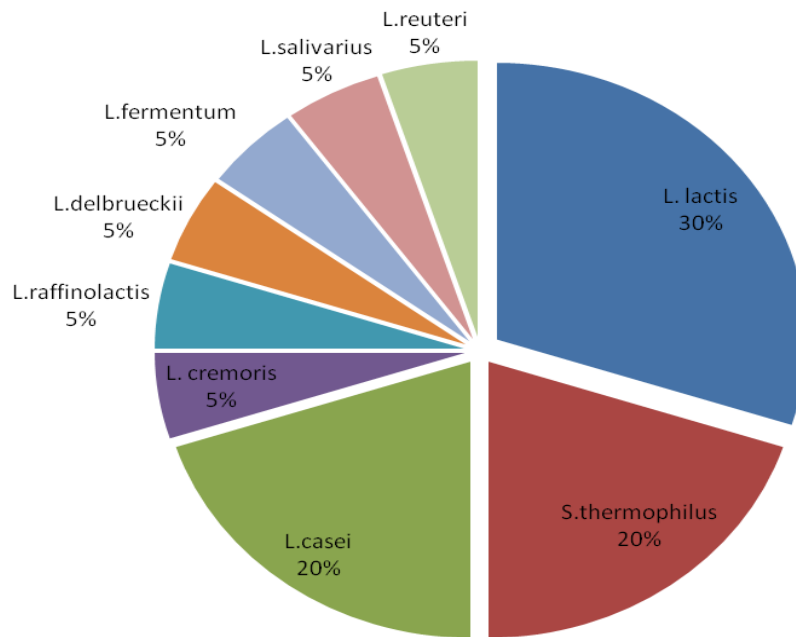
Ինչպես երևում է նկար 11-ից, թերմոստատում գլյուկոզ և լակտուլոզ պարունակող միջավայրերում *L. fermentum* LH15 շտամը շարունակում է աճը: Օհ-ները հասել են համապատասխանաբար 1.2 – ի (± 0.2): Այն դեպքում, ինչպես ծիրանենու կամեդը, այնպես էլ գլյուկոսպիրտ պարունակող միջավայրերում կուլտուրայի հետագա աճ և կենսազանգվածի կուտակում տեղի չի ունեցել, Օհ-ները մնացել են անփոփոխ: Մինչդեռ LAPT-M միջավայրում, որտեղ ածխածին պարունակող նյութեր չեն ավելացվել, տեղի է ունեցել Օհ – ի

զգալի անկում, որը վկայում է փորձարկված կամեդների պահպանիչ հատկությունների մասին:

ԱՄՓՈՓՈԼՄ

Մեր կողմից ուսումնասիրված հայ աստանաբնակ կանանց կրծքի կաթի նմուշներում լակտոբացիլների և լակտոկոկերի հարաբերությունը մոտավորապես կազմում է 2 : 3: ԿԹԲ-ների մեջ ամենահաճախ հանդիպում է *Lactococcus lactis* տեսակին պատկանող շտամները, մոտ 30%: Հզոր հակաբիոտիկ նիզին արտադրող լակտոկոկը նույն բարձր հաճախականությամբ հայտնաբերվել է նաև այլ երկրներում կատարված ուսումնասիրություններում, իսպանացի կանանց 75% և ֆինն կանանց 30%-ի կրծքի կաթի նմուշներում [14, 119, 160]: Այս շտամի հակաբակտերիալ բարձր կարողությունը թույլ է տալիս նրան առաջարկել որպես կենսաթերապևտիկ միջոց նորածինների և կերակրող մայրերի կրծքագեղձի բորբոքումները (մաստիտները) կանխարգելելու համար, որի առաջացման հիմնական պատճառը հանդիսանում է *Staphylococcus aureus* ախտածին միկրոբը [47, 59, 81, 94, 174]: Մեր կողից կատարված աշխատանքների վերլուծությունների արդյունքում պարզվեց, որ անջատված լակտոկոկերից առավել հաճախ հանդիպում են *Lactococcus lactis* ssp. շտամները (30%), երկրորդը՝ *Streptococcus thermophilus*-ը տեսակներին պատկանող շտամներն են (20%): Այնուհետև ըստ հաճախականության ներկայացված են *Lactococcus raffinolactis* և *Lactococcus cremoris* տեսակներին պատկանող շտամները: Լակտոբացիլներից առավել հաճախ հանդիպում են *Lactobacillus casei* ssp. (20%), *Lactobacillus delbrueckii* 5%, *Lactobacillus fermentum* 5%, *Lactobacillus salivarius* 5% և *Lactobacillus reuteri* 5% պատկանող տեսակները [Նկ.12]:

Որոշ հեղինակների կողմից, կուլտուրալ մեթոդով անցկացված փորձերի արդյունքը ցույց է տրվել, որ էնտերակոկերը և ստաֆիլակոկերը նույնպես հանդիսանում են կրծքի կաթի նորմալ միավորներ [96, 115, 119, 152]: Սակայն նման ախտածին տեսակների առկայությունը բավարար է որոշում ընդունելու, որ այդ կաթը օգտագործման ենթակա է:



Նկար 12. Հայաստանաբնակ կանանց մայրական կաթի նմուշներում հայտնաբերված կաթնաթթվային կոկերի և ցուպիկների տոկոսային հարաբերությունը

Հայտնի է, որ սննդակարգը և շրջակա միջավայրի պայմանները ազդում են աղիքային միկրոբիոմայի մանրէաբանական կազմի վրա: Նկատվել է, որ ճապոնացի կանանց կաթում հայտնի պրոբիոտիկ շտամների տարածվածությունն ավելի բարձր է համեմատած այլ երկրների կանանց կաթի, ինչը կարելի է ենթադրել, կապված է ֆունկցիոնալ սննդի, պրոբիոտիկների և տարբեր ֆերմենտացված սննդամթերքի լայն օգտագործման հետ որոնք ճապոնական սննդակարգի կարևոր մասն է հանդիսանում [176]:

Հայաստանաբնակ կանանց կրծքի կաթում ԿԹԲ-ների քանակները տատանվում են 2.0×10^4 և 1.0×10^5 ԳԱՄ/մլ, որը համընկնում է գրականությամբ ներկայացված տվյալների հետ: Քանի որ մեր կողմից ուսումնասիրված կանայք հիմնականում երևանից և նրա արվարձաններից են, որտեղ բնակչի մայական տարբերությունները զգալի չեն, մայրական կաթի միկրոբիոմայի քանակական տարբերությունն չի արձանագրվել: Մեկ այլ աշխատանքում ցույց է տրվել, որ քաղաքային և գյուղական կանանց կրծքի կաթում

դիտվող և ակտոբակտերիաների մակարդակը համապատասխանաբար 2.0×10^1 -ից մինչև 5.0×10^4 և 1.0×10^1 -ից մինչև 6.0×10^4 ԳԱՄ/մլ է (Աղ.27): Համարվում է, որ այդ թվերի համեմատաբար ցածր և ինքն ինքն է ապետել կարող ազդել երեխայի աղիքային միկրոբիոմայի զարգացման վրա [117, 119, 127]:

Աղյուսակ 27

ԿԹԲ-ների ընդհանուր քանակը տարբեր երկրներում վերցված կրծքի հասուն կաթի նմուշներում, ԳԱՄ/մլ

Երկիր	Քաղաքական	Գյուղական
Շվեդիա	1.7×10^2	4.2×10^2
Իսրայել	1.5×10^1	1.9×10^3
Հարավային Աֆրիկա	1.3×10^2	9.0×10^2
Ճապոնիա	$< 1.0 \times 10^1$	5.4×10^4
Պերու	2.4×10^2	$< 1.0 \times 10^1$
Հարավային Կորեա	1.1×10^3	1.4×10^4
Դանիա	2.0×10^2	7.5×10^1
Հայաստան	2.0×10^2	3.2×10^2

Հայաստանում ամենատարածված պրոբիոտիկ «Նարինե» կաթնամթերքի խմորիչ հանդիսացող *Lactobacillus helveticus* MDC 9206 շտամն է, որը սակայն հայաստանական կանանց կրծքի կաթի նմուշների մեր կողմից անցկացված հետազոտություններում չի հայտնաբերվել: Այդ երևույթը կարելի է բացատրել *L. helveticus*-ի էպիթելյալ և իմունային բջիջների մակերեսին ադիեզիայի չափազանց ցածր ունակությամբ: Հետաքրքիր է, որ հայտնի պրոբիոտիկ *L. acidophilus*-ը անջատվել և նկարագրվել է միայն մեկ

պետությունում, նույնը կարելի է ասել նաև բիֆիդոբակտերիաների վերաբերյալ :

Բազմաթիվ երկրներում հարյուրավոր կանանցից վերցրած մայրական կաթի նմուշների հետազոտությունները բացահայտեցին պրոբիոտիկների՝ Լակտոբակտերիաների և բիֆիդոբակտերիաների զգալի առկայություն, սակայն պրոբիոտիկ բակտերիաների պրոբիոցիաները տարբեր երկրների կանանց, ինչպես նաև քաղաքային և գյուղային կանանց կաթում քանակապես և որակապես նույնը չեն [20, 145]: Որոշ շրջաններում կաթի նմուշների միայն 20 տոկոսում են առկա պրոբիոտիկ մանրէներ, այն դեպքում երբ մյուսներում՝ մինչև 100 տոկոսում: Կրծքի կաթում ՊԲ-ների պակասի կամ քիչ քանակության պատճառներից մեկը կարող է լինել մոր կողմից դեռևս մանուկ հասակում արհեստական սննդի օգտագործումը և/կամ ֆերմենտացված կաթնամթերքի օգտագործման ցածր մակարդակը: Աղիքային միկրոֆլորան կրծքի կաթի միջոցով փոխանցվում է սերնդե - սերունդ և այդ շղթայի խախտման դեպքում այն վերականգնելու հնարավորությունը պակասում է: Իրավիճակը շտկելու ուղիներից մեկը մայր դառնալուց առաջ և հատկապես հղիության վերջին եռամսյակում առողջ կանանց կաթից առանձնացված հատուկ պրոբիոտիկների ինտենսիվ ընդունումն է [4, 5, 11, 17, 19, 166]: Առողջ մոր կրծքի կաթի մեջ ԿԹԲ-ների բարձր քանակը սկսած կյանքի առաջին օրերից հանդիսանում է երեխայի առողջության գլխավոր գրավականը:

Մոլեկուլային կենսաբանական ուսումնասիրությունները հաճախ խեղաթյուրում են կրծքի կաթի միկրոֆլորայի կենսաբանական նշանակությունը և նրա առկայության իմաստը կրծքի կաթում: Կուլտուրալ մեթոդի վրա հիմնված մանրէաբանական վերլուծությունը հաշվի է առնում միայն կենսունակ բջիջներն, այն դեպքում, երբ մոլեկուլային վերլուծությունը ներառում է բոլոր կենդանի, մեռած, ոչնչացված միկրոօրգանիզմները և նույնիսկ նրանց ԴՆԹ-ի բեկորները [36, 55, 114]: Կաթի հիմնական միկրոբիոմը կերակրող կանանց մոտ առաջանում է և երեխայի աղիքային համակարգ հասնելու ճանապարհին անցնում է մի շարք վերահսկիչ կետերով՝

1) Ենթադրվում է, որ մայրական աղեստամոքսային համակարգից որոշակի մանրէներ տեղափոխվում են մի մեխանիզմով, որում ներգրավված են միակորիզ իմունային բջիջներ, որոնք հասնում են կրծքագեղձեր բնական անդրկաթնային անցուղիով (the bacterial entero-mammary pathway) [149]:

2) Կրծքի կաթը պարունակում է հակամանրէային միացություններ, ինչպիսիք են լիզոցիմը, լակտոֆերինը, ինչպես նաև պաթոգեն միկրոօրգանիզմներից և դրանց բեկորներից մաքրող մոլեկուլներ՝ սքավենջերներ [15]:

3) Մանկան ստամոքսի թթվայնությունը (միջին pH 4,0) ճնշում է ախտածին մանրէներին, բայց ոչ ԿԹԲ-ներին:

4) Թթվակայուն կաթնաթթվային բակտերիաները շրջակա միջավայրի թթվայնացման և տարբեր հակաբիոտիկ նյութերի արտադրության միջոցով, վերացնում են այլ միկրոօրգանիզմներին, հատկապես ախտածին և դառնում գերակշռող մանկական աղիքային համակարգում [8, 41, 133, 135]:

Բազմաափսի խոչընդոտները, որոնց միջոցով գերակշռող մանրէները անցնում են կրծքի կաթ, կարող են լինել հիմնական պառճառներից մեկը, թե ինչու է երեխայի աղիքային միկրոբիոտան բաղկացած գրամդրական բակտերիաների համեմատաբար քիչ տեսակներից և ինչու է ավելի բազմազան միկրոբիոման զարգանում միայն կրծքի կաթից կտրվելուց հետո: Մանկական աղիներում հայտնվելուց հետո նման բակտերիաները պաշտպանիչ դեր են խաղում, որով կրծքով կերակրումը պայքարում է վարակիչ հիվանդությունների դեմ: Բնիկ պրոբիոտիկ բակտերիաները կարող են արտահայտել հակաբակտերիալ ակտիվություն նույնիսկ կրծքի կաթում: Ավելին, կրծքի կաթում լակտոբակտերիաների առկայությամբ կարելի է առնվազն մասնակիորեն բացատրել, նրանում պրոբիոտիկ օլիգոշաքարների գոյությունը, քանի որ վերջին ժամանակները ցույց է տրվել այդպիսի միացությունների սինթեզը մայրական կաթում լակտոբացիլների ֆրոկտոզիլ և գլյուկոզիլ տրանսֆերազների միջոցով: ՄԿՕԾ-ները կարող են ազդել ինչպես աղիների գաղութացման, այնպես էլ կրծքի կաթի

մանրէային համայնքի կազմի և քանակի վրա [22, 24, 25, 38, 42, 64, 121, 125, 131]:

Գրամբացասական բակտերիաների մեծամասնությունը զգայուն չեն լիզոցիմի հանդեպ, քանի որ դրանց արտաքին թաղանթը խանգարում է ֆերմենտի մուտքը պեպտիդոգլիկանային շերտ: Այնուամենայնիվ, այս խոչընդոտը հաղթահարվում է անբավարար իմունային համակարգերում՝ լակտոֆերինի արտադրությամբ, որը թափանցիկ է դարձնում արտաքին թաղանթը: Հայտնաբերվել է նաև, որ մայրական կաթից մեկուսացված գրամդրական պրոբիոտիկ բակտերիաներն ունեն բարձր կայունություն լիզոցիմի նկատմամբ: Այս երևույթը բացատրելու համար առաջարկվում է երկու մեխանիզմ՝

1) տվյալ բակտերիաներում լիզոցիմի սպիտակուցային ինհիբիտորների առկայություն,

2) լիզոցիմի թիրախ հանդիսացող բջջապատի պեպտիդոգլիկանի ձևափոխում (մոդիֆիկացիա):

Մեր կողմից ցույց տրվեց, որ անկախ ԿԹԲ-ների քանակից կրծքի կաթը չի մերվում: Հայտնի է, որ կաթնաթթվային բակտերիաները կովի կաթը մերում են կաթնաթթու արտադրելով և երբ թթվայնությունը հասնում է pH 5.5 ձևավորվում են կազեինային միցելներ, որոնք ջրի մոլեկուլները ներգրավելով առաջացնում են պինդ ժել: Ժելի գոյացման համար շատ կարևոր է կաթում տարբեր սպիտակուցների խտությունը: Մայրական կաթը ժել չի առաջացնում նախ, կազեինային սպիտակուցների ցածր կոնցենտրացիայով (0,4%), կովի կաթում այն կազմում է 2.5%: Բացի այդ, կովի կաթը ավելի թթվային է (pH 6.8), քան կրծքի կաթը (pH 7.3 ± 0.19): Կովի կաթի տիտրացվող թթվայնությունը նույնպես շատ ավելի բարձր է 18 - 20 °C, իսկ կրծքի կաթինը 5 - 6 °C: Կրծքի կաթը ունի նաև ցածր (0.3) բուժերային կարողություն, համեմատած կովի կաթի (1.2) հետ, ինչը հանգեցնում է աղիներում pH-ի նշանակալի տարբերությունների, համապատասխանաբար 5.1-ի և 6.5-ի: Ցածր pH-ը՝ նպաստելով բիֆիդոբակտերիաների և լակտոբակտերիաների աճին, միաժամանակ ճնշում է այլ բակտերիաների աճը:

Նկարներ 6 - ում և 7 - ում ներկայացված *In vivo* և *ex vivo* փորձերի արդյունքների համեմատությամբ ունից երևում է, որ կրծքագեղձերում 12 ժամվա ընթացքում մանրէների քանակը աճում է ընդամենը $1 \log$ -ով, այն դեպքում երբ փորձանոթում՝ $5 \log$ -ով: Այդպիսի էական տարբերությունը կարելի է բացատրել կրծքագեղձերի ծորանների սահմանափակ ծավալով, ինչպես նաև թարմ կաթի անընդհատ գոյացմամբ:

Խիժում կաթնաթթվային բակտերիաների ամենաբարձր քանակությամբ ունի կազմում է $10^4 - 10^5$, անցողիկ կաթում՝ $10^3 - 10^4$, որն աստիճանաբար կրճատվում է հասուն կաթում հասնելով միջինը $10^2 - 10^3$ ԳԱՄ/մլ: Հետազոտվող կաթի նմուշներում առկա ռեզիդենտ մանրէները մինչև 10^{-2-4} նոսրացումները 37°C - ում խմորում են կովի կաթը առաջացնելով թանձր մակարդուկ, սակայն մայրական կաթի նմուշները մնում են անփոփոխ այն դեպքում, երբ նրանում տեղի են ունենում ռեզիդենտ մանրէների՝ բացառապես ԿԹԲ-ների բուռն աճ, որի արդյունքում առավել կենսունակ մանրէների տիտրը հասնում է 10^{11} ԳԱՄ/մլ: Լոգարիթմական աճի վերջում կրծքի կաթում ներկայացված տեսակներից մեկը, հազվադեպ երկուսը, դառնում են գերակշռող:

Մայրական կաթի օլիգոշաքարները (ՄԿՕՇ) իրենցից ներկայացնում են կառուցվածքով բազմազան և բարձր փոփոխականությամբ ունեցող կենսաակտիվ ածխաջրերի խումբ: ՄԿՕՇ-ները բաղկացած են օլիգոշաքարների խառնուրդից, որոնք տարբերվում են ինչպես իրենց մոլեկուլային քաշով և կառուցվածքով, այնպես էլ բաղադրիչ շաքարով կամ շաքարային ածանցյալներով և լիցքով: Կառուցվածքային ձևով ՄԿՕՇ-ները բաղկացած են հինգ մոնոշաքարների՝ D- գլյուկոզի, D- գալակտոզի, N-ացետիլ գլյուկոզամինի, L-ֆրուկտոզի և սիալաթթվի համակցությամբ: Այս մոնոշաքարներից մի քանիսը հայտնաբերվել են նաև այլ կաթնասունների կաթի մեջ: Պրեբիոտիկների հավելումը մանկական խառնուրդներին կարող է որոշակիորեն նմանակել ՄԿՕՇ-ների ազդեցությանը արհեստական սնվող երեխաների մոտ: Մանկական սննդում որպես պրեբիոտիկներ օգտագործելու համար գնահատվել և գնահատվում են տարբեր

սննդային օլիգոշաքարների կարողությունները՝ գալակտոօլիգոշաքարներինը (ԳՕԾ), պոլիդեքստրոզինը, լակտուլոզինը, ինուլինինը և ֆրուկտոօլիգոշաքարներինը (ՖՕԾ): Բոլոր պոտենցիալ պրեբիոտիկները մարդու կողմից չյուրացվող ածխաջրեր են:

Ատենախոսական աշխատանքում ստուգվել է մայրական կաթից անջատված ԿԹԲ-ների կողմից տարբեր՝ բնական և սինթետիկ պրեբիոտիկների յուրացման արդյունավետությունը: Արհեստական պրեբիոտիկներից ստուգվել ենք լակտուլոզան, իսկ բնական պրեբիոտիկներից փորձարկվել են սենեգալյան ակացիայի և հայկական ծիրանենու կամեդները, վերջիններս ուսումնասիրվել են առաջին անգամ: Փորձերի արդյունքում եկանք այն եզրակացության, որ օգտագործման արդյունավետությամբ և կենսազանգվածի կուտակմամբ լակտուլոզը չի գիջում գլյուկոզին, այն դեպքում երբ սենեգալյան ակացիան և ծիրանենու կամեդը մասնակի են յուրացվում լակտոբակտերիաների կողմից և առաջացնում են ավելի քիչ կենսազանգված: Մյուս կողմից հաջողվեց պարզել, որ ուսումնասիրված բուսական կամեդները պաշտպանում են լակտոբակտերիաներին արտաքին միջավայրի վնասակար գործոններից և այդպիսով նպաստում են նրանց կենսունակության երկարատև պահպանմանը:

Հայտնի է, որ բուսական կամեդները ընդունակ են բակտերիալ բջջի շուրջ առաջացնել միկրոպատիճ, որը պաշտպանում է նրանց միջավայրի վնասակար գործոնների ազդեցությունից: Միկրոպատիճավորումը կամեդների օգտագործմամբ լայն կիրառություն ունի բժշկության, կենդանի պրոբիոտիկ միկրոօրգանիզմներ պարունակող կենսապատրաստուկների արտադրության մեջ՝ պահպանման ժամկետը երկարացնելու նպատակով: Ծիրանենու կամեդը նույնպես կարելի է առաջարկել մանկական սննդում ներգրավելու, աղիքային միկրոֆլորայի լավացման և պահպանման համար:

ԵԶՐԱԿԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

1. Հայաստանաբնակ առողջ կանանց կրծքի կաթում գլխավորապես տարածված են լակտոկոկերը և լակտոբացիլները մոտավորապես 3 : 2 հարաբերությամբ:
2. Կաթնաթթվային բակտերիաների քանակը խիժում 10^{4-5} , անցումային կաթում 10^{3-4} , իսկ հասուն կաթում 10^{2-3} ԳԱՄ/մլ է:
3. Կրծքի կաթից անջատված կաթնաթթվային լակտոբացիլները արագ, իսկ լակտոկոկերը համեմատաբար դանդաղ են մերում կովի կաթը, սակայն չեն մերում մայրական կաթն, որը պայմանավորված է վերջինում կազեինների ոչ բավարար քանակով և pH-ի բարձրությամբ:
4. Կախված երեխայի կերակրելու պարբերությունից կրծքի կաթում կաթնաթթվային բակտերիաների քանակը տատանվում է: 12 ժամ չկերակրված կրծքում նրանց քանակը մոտ 10^6 անգամ ավելի է 3–4 ժամ պարբերությամբ կերակրված կրծքի համեմատ:
5. Առաջին անգամ, *ex vivo* փորձերում ցույց է տրվել, որ ինտակտ կրծքի կաթում առկամիկրոօրգանիզմները 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 բարձր ակտիվությամբ օժտված կաթնաթթվային բակտերիաների մեկ, հազվադեպ երկու տեսակ: Դրանով կարելի է բացատրել երեխայի աղիներում ԿԹԲ-ների սահմանափակ տեսակային ներկայությունը:

6. Մայրական կաթից անջատված ԿԹԲ-ների կողմից սինթետիկ պրեբիոտիկ լակտուլոզի յուրացման և նրանց աճի խթանման արդյունավետությամբ չի զիջում գլյուկոզին:
7. Բուսական բնական արտազատուկներից հայկական ծիրանենու և ակացիայի կամեդների միայն 15 - 20% է յուրացվում ԿԹԲ-ների կողմից: Նրանց հիմնական բաղադրիչներ հանդիսացող, կենսաբանական ակտիվությամբ օժտված գլյուկոլորանան և արաբիևոգալակտանը պաշտպանում են բջիջները շրջակա անբարենպաստ պայմաններից և սթրեսներից:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅԱՆ ՑԱՆԿ

1. Arbolea S., Ruas-Madiedo P., Margolles A., Solis G., Salminen S., De los Reyes Gavilan C. and Gueimonde M., Characterization and *in vitro* properties of potentially probiotic *Bifidobacterium* strains isolated from breast-milk. // International Journal of Food Microbiology. 2011, Vol. 149, p. 28–36.
2. Aaltonen J., Ojala T., Laitinen K., Poussa T., Ozanne S., Isolauri E., Impact of maternal diet during pregnancy and breastfeeding on infant metabolic programming: a prospective randomized controlled study. // Eur. J. Clin. Nutr. 2011, Vol. 65, p. 9– 10.
3. Adlerberth I., Wold A. E., Establishment of the gut microbiota in Western infants. // Acta Pediatr. 2009, p. 229 – 238.
4. Albesharat R., Ehrmann M., Korakli M., Yazaji S. and Vogel R.F., Phenotypic and genotypic analyses of lactic acid bacteria in local fermented food, breast milk and faeces of mothers and their babies. // Systematic and Applied Microbiology. 2011, Vol. 34, p. 148-155.

5. Allen J.C., Keller R.P., Archer P., Neville M.C., Studies in human lactation: milk composition and daily secretion rates of macronutrients in the first year of lactation. // J. Clin. Nutr. 1991, Vol. 54, p. 69-80.
6. Aurand L.W., Woods A.E., Wells M.R., Food composition and analysis. // Van Nostrand Reinhold, New York, 1987, p.543-595.
7. Angelis M., Siragusa S., Berloco M., Caputo L., Settanni L., Alfonsi G., Amerio, M., Grandi A., Ragni A. and Gobbetti M., Selection of potential probiotic *Lactobacilli* from pig feces to be used as additives in pelleted feeding. // Research in Microbiology. 2006, Vol. 157, p. 792-801.
8. Arroyo R., Martí'n V., Maldonado A., Jime'nez E., Fernandez L., and Rodriguez J. M., Treatment of Infectious Mastitis during Lactation: Antibiotics versus Oral Administration of *Lactobacilli* Isolated from Breast Milk. // Clinical Infectious Diseases. 2010, Vol. 50/12, p. 1551–1558.
9. Arvola T., Ruuska T., Keränen J., Hyöty H., Salminen S. and Isolauri E. Rectal bleeding in infancy: clinical, allergological and microbiological examination. // Pediatrics. 2006, Vol. 117, p. 760-768.
10. Aurand L.W., Woods A.E., Wells M. R., Food composition and analysis. // Van Nostrand Reinhold. New York, 1987, p. 543-595.
11. American Academy of Pediatrics (AAP) Breastfeeding and the use of human milk. // Pediatrics. 2012, Vol. 129, p.827–841.
12. Backhed F., Ley R.E., Sonnenburg J.L., Peterson D.A., Gordon J.I., Host-bacterial mutualism in the human intestine. // Science. 2005, Vol. 307, p. 1915-1920.
13. Brady L.J., Gallaher D.D., Busta F.F., The role of probiotic cultures in the prevention of colon cancer. // The Journal of Nutrition. 2000, Vol. 130, p. 410S-414S.
14. Beasley S.S., Saris P.E., Nisin-producing *Lactococcus lactis* strains isolated from human milk. // Applied and Environmental Microbiology. 2004, Vol. 70, p. 5051–5053.
15. Bhatt V.D., Vaidya Y.H., Kunjadia P.D., Kunjadia A.P., Isolation and characterization of probiotic bacteria from human milk. // Inter. Journal of pharmaceutical science and health care. 2012, Issue 2. Vol. 3. P. 62-70.
16. Berg R.D., Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. // Trends Microbiol. 1995, Vol. 3, p. 149–154.

- 17.** Blum J. W., Baumrucker C.R., Colostral and milk insulin-like growth factors and related substances: mammary gland and neonatal (intestinal and systemic) targets. // Dom. Anim. Endocrin. 2002, Vol. 23, p. 101–110.
- 18.** Bertotto A., Gerli R., Castellucci G., Scalise F., Vaccaro R., Human milk lymphocytes bearing the gamma/delta T-cell receptor are mostly delta TCS1-positive cells. // Immunology. 1991, Vol. 74, p.360–361.
- 19.** Bezkorovainy A., Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. // Am. J. Clin. Nutr. 2001, Vol. 73, p.399-405.
- 20.** Brown K.H., Black R.E., Lopez de Romaña G., Creed de Kanashiro H., Infant-feeding practices and their relationship with diarrheal and other diseases in Huascar (Lima), // Pediatrics. Peru. 1989, Vol. 83, p.31–40.
- 21.** Bode L., Jantscher-Krenn E., Structure-function relationships of human milk oligosaccharides. // Adv. Nutr. 2012, Vol. 3, p. 383-391.
- 22.** Blank D., Dotz V., Geyer R., Kunz C., Human milk oligosaccharides and Lewis blood group: individual high-throughput sample profiling to enhance conclusions from functional studies. // Adv. Nutr. 2012, Vol 3, p.440–449.
- 23.** Brandtzaeg P., “ABC” of mucosal immunology, Nestle Nutr. Workshop Ser. // Pediatr. Program. 2009, Vol. 64, p. 23–38.
- 24.** Bode L.R., Advances on structure, metabolism, and function of human milk oligosaccharides. // J. Nutr. 2006, Vol. 136, p.2127–2130.
- 25.** Bode L., Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama. // Glycobiology. 2012, Vol. 22, p.1147–62.
- 26.** Buccigrossi V., Nicastro E., Guarino A., Functions of intestinal microflora in children. // Current Opinion in Gastroenterology. 2013, Vol. 29, p. 31-38.
- 27.** Cabrera-Rubio R., Collado M.C., Laitinen K., Salminen S., Isolauri E. and Mira A., The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. // American Journal of Clinical Nutrition. 2012, Vol. 96/3 p.544-551.
- 28.** Caplice E., Fitzgerald G.F., Food fermentation: role of microorganisms in food production and preservation. // Int. J. Food Microbiol. 1999, Vol. 96, p.131-149.
- 29.** Casas I.A., Dobrogosz W.J., Validation of the probiotic concept: *Lactobacillus reuteri* confers broad-spectrum protection against disease in humans and animals. // Microb. Ecol. Health Dis. 2000, Vol. 12, p.247-85.

30. Costello E.K., Lauber C.L., Hamady M., Fierer N., Gordon J., Knight R., Bacterial community variation in human body habitats across space and time. // Science. 2009, Vol. 326, p. 1694–1697.
31. Chantry C.J., Wiedeman J., Buehring G., et al., Effect of flash-heat treatment on antimicrobial activity of breastmilk. // Breastfeed Med., 2011, Vol. 6/3. p. 111–116.
32. Coeuret V., Dubernet S., BernardeauM., Gueguen M., Vernoux J.P., Isolation characterization and identification of *Lactobacilli* focusing mainly on cheeses and other dairy products. // INRA Editions. 2003, Vol. 83/4, p. 269-306.
33. Collado M.C., Meriluoto J., Salminen S., Measurement of aggregation properties between probiotics and pathogens: *In vitro* evaluation of different methods. // J. of Microbiol. Methods, Amsterdam. 2007, Vol. 71, p. 71-74.
34. Collado M.C, Isolauri E., Laitinen K., Salminen S., Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. // Am. J. Clin. Nutr. 2008, Vol. 88, p. 894–899.
35. Collado M.C., Isolauri E., Laitinen K., Salminen S., Effect of mother's weight on infant's microbiota acquisition, composition, and activity during early infancy: a prospective follow-up study initiated in early pregnancy. // Am J. Clin. Nutr. 2010, Vol. 92, p. 1023–1030.
36. Collado M.C., Delgado S., Maldonado A. and Rodriguez J.M., Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR. // Letters in Applied Microbiology. 2009, Vol. 48, p. 523-528.
37. Collins M.D., Gibson G.R., Probiotics, prebiotics and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. //The American Journal of Clinical Nutrition. 1999, Vol. 69, p. 1052-1057.
38. Coppa G., Pierani P., Zampini L., Bruni S., Carloni I., Gabrielli, Characterization of oligosaccharides In milk and feces of breast-fed infants by high-performance anion-exchange chromatography. //Adv. Exp. Med. Biol. 2001, Vol. 61, p. 501-507.
39. Costalos C., Kapiki A., Apostolou M., Papathoma E., The effect of a prebiotic 2 supplemented formula on growth and stool microbiology of term infants. // Early Hum. Dev. 2008, Vol. 326, p. 45–49.
40. Costello E.K., Lauber C.L., Hamady M., Fierer N., Gordon J., et al. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. // Science. 2009, Vol. 84, p. 1694–1697.

41. Conway P.L., Gorbach S. L. and Goldin B.R., Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. // Journal of Dairy Science. 1987, Vol. 70, p. 1-12.
42. Chaturvedi P., Warren C.D., Altaye M., Morrow A.L., Ruiz-Palacios G., et al., Fucosylated human milk oligosaccharides vary between individuals and over the course of lactation. // Glycobiology. 2001, p. 365–372.
43. Dubos C., Vega N., Carvallo C., Navarrete P., Cerda C., Brunser O., Gotteland M., Identification of *Lactobacillus* spp. in colostrum from Chilean mothers. // Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición. 2011, Vol. 61, p. 66-68.
44. Danielyan L. V., Hovhannisyan H.G., The study of lactic acid bacteria isolated from human breast milk in Armenia. // Biolog. Journal of Armenia. 2016, Special Issue, p.13-18.
45. Dasanayake A.P., Li Y., Wiener H., Ruby J.D., Lee M.J., Salivary *Actinomyces naeslundii* genospecies 2 and *Lactobacillus casei* levels predict pregnancy outcomes. // J. Periodontol. 2005, Vol. 76, p. 171–177.
46. Delgado S., Arroyo R., Jimenez E., Fernandez L. and Rodriguez J. M., Infections mastitis during lactation: an underrated condition (I). // Acta Pediatrica Espanola. 2009a, Vol. 67, p. 77-84.
47. Delgado S., Arroyo R., Martin R. and Rodriguez J. M., PCRD GGE assessment of the bacterial diversity of breast milk in women with lactational infections mastitis. // BMC Infectious Diseases. 2008, Vol. 8, p. 1-8.
48. De Vuyst L., Degeest B., Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. // FEMS Microbiol.Rev. 1999, Vol. 15, p. 153-157.
49. Dunne C., O'Mahony L., Murphy L., Thornton G., Morrissey D., O'Halloran S., Feeney M., Flynn S., Fitzgerald G., Daly C., Kiely B., O'Sullivan G., Shanahan F., and Collins J.K., *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: Correlation with *in vivo* findings. // Am. J. Clin. Nutr. 2001, Vol. 73, p. 386-392.
50. Diaz-Ropero M.P., Martin R., Sierra S., Villoslada L., Rodriguez J.M., Xaus J., Olivares M., Two *Lactobacillus* strains isolated from breast milk differently modulate the immune response. // J. Appl. Microbiol. 2006, Vol. 102, p. 337-343.
51. De Vos W.M., Bron P.A., Kleerebezem M., Post-geomics of lactic acid bacteria and other food-grade bacteria to discover gut functionality. Curr.Opin. // Biotech. 2004, Vol. 15, p.86-93.

- 52.** Dominguez-Bello M.G., Costello E.K., Contreras M., Magris M., Hidalgo G., Fierer N., Knight R., Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. // *Proc Natl Acad Sci. USA*, 2010, Vol. 107, p. 971–975.
- 53.** Donnet-Hughes A., Duc N., Serrant P., et al. Bioactive molecules in milk and their role in health and disease: the role of transforming growth factor- β . // *Immunol. Cell Biol.* 2000, Vol. 78, p. 74–9.
- 54.** Dugas B., Mercenier A., Lenoir-Wijnkoop I., Arnaud C., Dugas N. and Postaire, Immunity and probiotics. // *Trends Immunology Today* E. 1999, Vol. 20/9, p. 387-390.
- 55.** Ecolini D., Moschetti G., Blaiotta G. and Coppola S., Behavior of variable V3 region from 16S rDNA of lactic acid bacteria in denaturing gradient gel electrophoresis. // *Curr. Microbiol*, 2001, Vol. 42, p. 199-202.
- 56.** Favier C.F., De Vos W.M. and Akkermans A.D., Development of bacterial and bifidobacterial communities in feces of newborn babies. // *Anaerobe*. 2003, Vol. 9, p. 219-229.
- 57.** Farhana S.D., Khondoker M.H., Azim M.A. and Md. Moinul Hoque, Isolation, Characterization and Determination of Antimicrobial Properties of Lactic Acid Bacteria from Human Milk. 2013, Vol. 6/2, p.11-116.
- 58.** Federico L.V., Olivaresl M., Sierral S., Rodriguez J.M. and Xaus J., Beneficial effects of probiotic bacteria isolated from breast milk. // *British J. Nutrition*. 2007, Vol. 98, p. 96–100.
- 59.** Fernández L., Delgado S., Herrero H., Maldonado A. and Rodríguez J.M., The bacteriocin nisin, an effective agent for the treatment of staphylococcal mastitis during lactation. // *Journal of Human Lactation*. 2008, p. 311-316.
- 60.** Fernandez L., Langa S., Martin V., Maldonado A., Jimenez E., Martin R. and Rodriguez J.M., The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. // *Pharmacological Research*. 2013, Vol. 69, p.1-10.
- 61.** Fooks L.J., Fuller R. and Gibson G.R., Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. // *Int. Dairy J.* 1999, Vol. 9, p. 53-61.
- 62.** FAO/WHO. Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria. // Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization expert consultation report. FAO, Rome, Italy, 2001.

- 63.** Gao X., Mc Mahon R.J., Woo J.G., Davidson B.S., Morrow A.L., Zhang Q. Temporal changes in milk proteomes reveal developing milk functions. // J. Proteome Res. 2012, Vol. 11/7, p. 3897–3907.
- 64.** Gabrielli O., Zampini L., Galeazzi T., Padella L., Santoro L., Peila C., Giuliani F., Bertino E., Fabris C., Coppa G.V., Preterm milk oligosaccharides during the first month of lactation. // Pediatrics. 2011, Vol. 128/6, p. 1520–1531.
- 65.** Gismondo M.R., Drago L., Lombardi A., Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. // Int. J. Antimicrob Agents, 1999, Vol. 12, p. 287-292.
- 66.** Guarner F., Perdigon G., Corthier G., Salminen S., Koletzko B., et al, Should yoghurt cultures be considered probiotic? // Br. J. Nutr. 2005, Vol. 93, p. 783-786.
- 67.** Gill H.S. and Rutherford K.J., Viability and dose–response studies on the effects of the immunoenhancing lactic acid bacterium *Lactobacillus rhamnosus* in mice. // Br. J. Nutr. 2001, Vol. 86, p. 285–289.
- 68.** Gill H.S., Stimulation of the immune system by lactic cultures. // Int. Dairy J. 1998, Vol. 8, p. 535–544.
- 69.** Gibson G.R., Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. // J. Nutr. Suppl. 1999, Vol. 129/7, p. 1438-1441.
- 70.** Gibson G.R., Roberfroid M.B., Dietary modulation of the human colonic microbiota introducing the concept of prebiotics. // J. Nutr. 1995, Vol. 125, p. 1401-1412.
- 71.** Gotteland M., Cruchet S., Brunser O., Functional Food in Child Nutrition. // In J. Smith and E. Charter Eds. Functional Food Product Development Blackwell Publishing Ltd. 2010, p. 440-458.
- 72.** Groñlund M.M., Gueimonde M., Laitinen K., Kociubinski G., Groñroos T., Salminen S., Isolauri E., Maternal breast-milk and intestinal bifidobacteria guide the compositional development of the *Bifidobacterium* microbiota in infants at risk of allergic disease. // Clin Exp Allergy. 2007, Vol. 37, p. 1764–1772.
- 73.** Groñlund, M.M., Arvilommi H., Kero P., Lehtonen O.P. and Isolauri E. Importance of intestinal colonization in the maturation of humoral immunity in early infancy: a prospective follow up study of healthy infants aged 0–6 months. // Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2000, Vol. 79, p. 186–192.
- 74.** Gueimonde M., Laitinen K., Salminen S., and Isolauri E., Breast milk: a source of bifidobacteria for infant gut development and maturation? // Neonatology. 2007, Vol. 92, p. 64-66.

- 75.** Guarner F. and Malagelada J.R., Gut flora in health and disease. // The Lancet. 2003, Vol. 361, p. 512-519.
- 76.** Groux H., Bigler M., de Vries J.E. and Roncarolo M.G., Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. // J. Exp. Med. 1996, Vol. 184, p. 19–29.
- 77.** Grice E.A., Kong H.H., Conlan S., Deming C.B., Davis J. et al. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. // Science. 2009, Vol. 324, p. 1190–1192.
- 78.** Hunt K.M., Foster J.A., Forney L.J., Schutte U.M., Beck D.L., Abdo Z., Fox L.K., Williams J.E., McGuire M.K., McGuire M.A., Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. // PLoS ONE. 2011, 6/6, e21313.
- 79.** Hahn Zoric M., Fulconis F., Minoli I., Moro G., Carlsson B., Bottiger M., Räihä N. and Hanson L., Antibody response to parenteral and oral vaccines are impaired by conventional and low protein formulas as compared to breast-feeding. // Acta. Paediatr. Scand. 1990, Vol. 79, p. 1137–1142.
- 80.** Hammond K.A., // Adaptation of the maternal intestine during lactation. J. Mammary Gland Biol Neoplasia. 1997, Vol. 2, p. 243–252.
- 81.** Heikkilä M.P. and Saris P.E., Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. // J. Appl. Microbiol. 2003, 95, p. 471-478.
- 82.** Hirayama K. and Raffe J., The role of Probiotic bacteria in cancer prevention. // Microbes and Infection. 2000, Vol. 2, p. 681-686.
- 83.** Holzapfel W.H., Haberer P., Snell J., Schillinger U. & Huis in't Veld, J., Overview of gut flora and probiotics. // International Journal of Food Microbiology. 1998, Vol. 41, p. 85-101.
- 84.** Hoppu U., Isolauri E., Laakso P., Matomaäki J., Laitinen K., Probiotics and dietary counselling targeting maternal dietary fat intake modifies breast milk fatty acids and cytokines. // Eur. J. Nutr. 2012, Vol. 51, p. 211–219.
- 85.** Hovhannisyan H.G., Topchyan H.V., Barseghyan A. H., Revazova L.V., Grigoryan N. G., R.M. Bagumyan., Development of probiotics, prebiotics and synbiotics from Armenian natural sources. // Proceed of the inter.conf. "Advanced Biotechnology: Perspectives of Development in Armenia". 2006, Tsakhkadzor, p. 24.

- 86.** Hunt K.M., Foster J.A., Forney L.J., Schu"tte U.M., Beck D.L., Abdo Z., Fox L.K., Williams J.E., Mc Guire M.K., Mc Guire M.A., Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. // PLoS ONE. 2011, 6:e21313.
- 87.** Huurre A., Kallioma"ki M., Rautava S., Rinne M., Salminen S., Isolauri E., Mode of delivery-effects on gut microbiota and humoral immunity. // Neonatology, 2008, 93, p. 236–40.
- 88.** Isaacs C.E., Human milk inactivates pathogens individually, additively and synergistically. // Journal of Nutrition. 2005, Vol. 135, p. 1286-1288.
- 89.** Jara S.M., Sanchez R., Vera J., Cofre and Castro E., The inhibitory activity of *Lactobacillus* spp. isolated from breast milk on gastrointestinal pathogenic bacteria of nosocomial origin. // Anaerobe. 2011, Vol. 17, p. 474-477.
- 90.** Jay J.M., Fermentation and fermented dairy products: Modern Food Microbiology, 6th edition. // An Aspen Publication. Inc. Gaithersburg. USA. 2000, p. 113-130.
- 91.** Jeurink P.V., Van Bergenhenegouwen J., Jimenez E., Knippels L.M., Fernandez L., Garssen J., Knol J., Rodriguez J.M. and Martin R., Human milk: a source of more life than we imagine. // Beneficial Microbes. 2013, Vol. 4, p. 17-30.
- 92.** Jennifer T.S., Carlito B.L., David A. Mills, Bruce German J. and Samara L. F., Breast Milk Oligosaccharides: Structure-Function Relationships in the Neonate. //Annu. Rev. Nutr. 2014, Vol. 34, p. 143–169.
- 93.** Jiménez E., Fernández L., Marín M.L., Martín R., Odriozola J.M., Nueno-Palop C., Narbad A., Olivares M., Xaus J., Rodríguez J.M., // Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by caesarean section. Curr. Microbiol. 2005, Vol. 51, p. 270–274.
- 94.** Jimenez E., Delgado S., Arroyo R., Fernandez L. and Rodriguez J.M., Infectious mastitis during lactation: an underrated condition (II). // Acta Pediatrica Espanola. 2009, Vol. 67, p. 125-132.
- 95.** Johnston M., Landers S., Noble L., Szucs K., Viehmann L., Breastfeeding and the use of human milk. // Pediatrics. 2012, Vol. 129/3, p. 827–841.
- 96.** Jimenez E., Delgado S., Maldonado A., Arroyo R., Albujar M., Garcia N., Jarrod M., Fernandez L., Gomez A. and Rodriguez J.M., *Staphylococcus epidermidis*: a differential trait of the fecal microbiota of breast-fed infants. // BMC Microbiology. 2008a, Vol. 8, p. 143.

- 97.** Kaila M., Isolauri E., Soppi E., Virtanen E., Laine S. and Arvilommi
Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea
by a human *Lactobacillus* strain. // *Pediatr Res.* 1992, Vol. 32, p. 141–144.
- 98.** Kalliomäki M., Collado M.C., Salminen S., Isolauri E., Early differences in
faecal microbiota composition in children may predict later weight gain? // *Am. J.*
Clin. Nutr. 2008, Vol. 87, p. 534–538.
- 99.** Kunz C., Rudloff S., Schad W., Braun D., Lactose-derived oligosaccharides in
the milk of elephants: comparison with human milk. // *Br. J. Nutr.* 1999, Vol. 82/5, p.
391-9.
- 100.** Kandler O., Weiss N., Regular nonsporing gram-positive rods, In P.H.A.
Sneath, Mair N.S., Sharpe M.E., HOLT J.G.(ed.), *Bergey's manual of systematic*
bacteriology. The Williams & Wilkins Co., // Baltimore, Md. 1986, Vol. 2, p. 1208-
1234.
- 101.** Kuipers O.P., Buist G., Kok J., Current strategies for improving food bacteria.
// *Res. Microbiol.* 2000, Vol. 151, p. 815-822.
- 102.** Kavitha J.R. and Devasena T., Isolation, Characterization, Determination of
Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria from Human Milk. // *Journal of*
Pharmacy and Biological Sciences. 2013, Vol. 7/3, p.1-7.
- 103.** Kubota T., and all, Prebiotic consumption in pregnant and lactating women
increases IL-27 expression in human milk. // *British Journal of Nutrition* 2014, Vol.
111, p.625–632.
- 104.** Kulski J.K., Hartmann P.E., Changes in human milk composition during the
initiation of lactation. // *Aust J. Exp. Biol. Med. Sci.* 1981, Vol. 59/1, p. 101–114.
- 105.** Lawrence R.M., Host resistance factors and immunologic significance of
human milk. In Lawrence RA & Lawrence RM (eds.): // *Breastfeeding: A Guide for*
the Medical Profession. 6th edition, St Louis, Mosby. 2005, p.171-214.
- 106.** Lara-Villoslada F., Olivares M., Sierra S., Rodríguez J.M., Boza J. and Xaus
J., Beneficial effects of probiotic bacteria isolated from breast milk. // *British*
Journal of Nutrition. 2007, Vol. 98/1, p. 96-100.
- 107.** Langa S., Interactions between lactic acid bacteria, intestinal epithelial cells
and immune cells: development of in vitro models [dissertation]. Madrid (Spain):C
omplutense University of Madrid, 2006.
- 108.** Langa S., Maldonado A., Delgado S., Martín R., Martín V., Jiménez E., Ruíz-
Barba J.L., Mayo B., Connor R.I., Suárez E., et al. Characterization of *Lactobacillus*

- salivarius* CECT 5713, a strain isolated from human milk: from genotype to phenotype. // Appl Microbiol Biotechnol. 2012, Vol. 94, p. 1279–1287.
- 109.** LeBouder E., Rey-Nores J.E., Raby A.C., Affolter M., Vidal K., Thornton C.A., Labe'ta M.O., Modulation of neonatal microbial recognition: TLR mediated innate immune responses are specifically and differentially modulated by human milk. // J. Immunol. 2006, Vol. 176, p. 3742–3752.
- 110.** Mah K.W., Björkstén B., Lee B.W., van Bever H.P., Shek L.P., Tan T.N., Lee Y.K. and Chua K.Y., Distinct pattern of commensal gut microbiota in toddlers with eczema. // Int. Arch. Allergy Immunol. 2006, Vol. 140, p. 157-16.
- 111.** Minna M.R., Miguel G., Marko K., Ulla H., Seppo J.S., Erika I. Similar bifidogenic effects of prebiotic supplemented partially hydrolyzed infant formula and breastfeeding on infant gut microbiota. // FEMS Immun. Med. Microbiol., 2005, Vol. 43, p. 59–65.
- 112.** Makino H., Kushiro A., Ishikawa E., Muylaert D., Kubota H., Sakai T., Oishi K., Martin R., Ben Amor K., Oozeer R., Knol J. and Tanaka R., Transmission of intestinal *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* strains from mother to infant, determined by multilocus sequencing typing and amplified fragment length polymorphism. // Applied and Environmental Microbiology. 2011, Vol. 77, p. 6788-6793.
- 113.** Malthotra S.L., // Dietary factors in a study of cancer colon from cancer registry with special reference to the role of saliva, milk and fermented milk products and vegetable fibre in the diet. Medical Hypotheses. 1977b, Vol. 3/3, p. 122.
- 114.** Martín R., Jiménez E., Heilig H., Fernández L., Marín M.L., Zoetendal E.G., Rodríguez J.M., Isolation of bifidobacteria from breast milk and sessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. // Appl Environ Microbiol. 2009, Vol. 75, p. 965-969.
- 115.** Martín R., Langa S., Reviriego C., Jiménez E., Marín M.L., Xaus J., Fernández L. and Rodríguez J.M., Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. // J. Pediatr. 2003, Vol. 143, p. 754-758.
- 116.** Martin R., Jimenez E., Olivares M., Fernández L., Xausb J. and Rodríguez J.M., *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a potential probiotic strain isolated from infant feces and breast milk of a mother–child pair. // International Journal of Food Microbiology. 2006, Vol. 112, p. 35-43.

- 117.** Martin R., Heilig H.G., Zoetendal E.G., Jimene, E., Fernandez L., Smidt H. and Rodriguez J.M., Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. // *Research in Microbiology*. 2007a, Vol. 158, p. 31-37.
- 118.** Martin R., Heilig H.G., Zoetendal E.G., Smidt H. and Rodriguez J.M., Diversity of the *Lactobacillus* group in breast milk and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut. // *Journal of Applied Microbiology*. 2007b, Vol. 103, p. 2638-2644.
- 119.** Martin R., Langa S., Reviriego C., Jimenez E., Marin L.M., Olivares M., Boza J., Jimenez J., Fernandez L., Xaus J. and Rodriguez J.M., The commensal microflora of human milk: New perspectives for food bacteriotherapy and Probiotics. // *Trends in Food Science & Technology*. 2004, Vol. 15, p. 121-127.
- 120.** Martin V., Maldonado A., Moles L., Rodriguez-Banos M., Del Campo R., Fernandez L., Rodriguez J.M. and Jimenez E., Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces. // *Journal of Human Lactation*. 2012, Vol. 28, p. 36-44.
- 121.** Marcobal A., Sonnenburg J.L., Human milk oligosaccharide consumption by intestinal Microbiota. // *Clin. Microbiol. Infect.* 2012, Vol. 18, p. 12–15.
- 122.** Macpherson A.J., Uhr T., Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. // *Science*. 2004, Vol. 303, p. 1662–1665.
- 123.** Marwa K.S., Iman E.W., Abd E.I., Fattah Attia M.H., Wael M.N., Lotfy, Nayra Sh. Mehanna, Amal El- Taweel, Isolation of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* Species from Human Breast Milk. // *Egyptian Journal of Medical Microbiology*. 2015, Vol. 24/3, p. 69-73.
- 124.** Medellin-Peña M.J. and Griffiths M.W. Effect of Molecules Secreted by *Lactobacillus acidophilus* strain La-5 on *Escherichia coli* O157:H7 Colonization. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2009, Vol. 75, p. 1165–1172.
- 125.** Moro G., Minoli I., Mosca M., Fanaro S., Jelinek J., Stahl B., Boehm G., // Dosage-related bifidogenic effects of galacto and fructooligosaccharides in formula-fed term infants. *J. Pediatr. Gastroenterol Nutr.* 2002, 34, p. 291–295.
- 126.** Morera S.P., Castellote A., Bargallo Â., Campoy C.F., Lo Âpez S.MC., Triacylglycerol composition in colostrum, transitional and mature human milk. // *European Journal of Clinical Nutrition*. 2000, Vol. 54, p. 878–882.

- 127.** Nayra S.H. Mehanna, Nabil F. Tawfik, Moussa M.E. Salem, Baher A.M. Effat and D.A. Gad El-Rab, Assessment of Potential Probiotic Bacteria Isolated from Breast Milk. // Middle-East Journal of Scientific Research. 2013, Vol. 14/3, p. 354-360.
- 128.** Newburg D.S., Bioactive Components of Human Milk. // Springer. New York, 2001, Vol. 135, p. 307-314.
- 129.** Newburg D.S. and Walker W.A., Protection of the neonate by the innate immune system of developing gut and of human milk. // Pediatr. Res. 2007, Vol. 61, p. 2-8.
- 130.** Newburg D.S., Innate immunity and human milk. //Journal of Nutrition. 2005, Vol. 135, p. 1308-1312.
- 131.** Newburg D.S., Shen Z., Warren C.D. Quantitative analysis of human milk oligosaccharides by capillary electrophoresis. // Adv. Exp. Med. Biol. 2000, Vol. 478, p. 381–382.
- 132.** Nigatu A., Evaluation of numerical analyses of RAPD and API 50 GH patterns to Differentiate *Lactobacillus plantarium*, *Lact. fermentum*, *Lact. rhamnosus*, *Lact. sake*, *Lact. parabuchneri*, *Lact. gallinarum*, *Lact. casei*, *Weissella minor* and related taxa isolated from kocho and tef. // J. Appl. Microbiol. 2000, Vol. 89/6, p. 969-978.
- 133.** Ouwehand A.C., Isolauri E., He F., Hashimoto H., Benno Y., Salminen S., Differences in Bifidobacterium flora composition in allergic and healthy infants. // J. Allergy Clin. Immunol. 2001, Vol. 108, p. 144–5.
- 134.** Oftedal O.T., The mammary gland and its origin during synapsid evolution, // J. Mammary Gland Biol. Neoplasia, 2002, Vol. 7, p. 225–52.
- 135.** Olivares M., Diaz-Ropero M.P., Martin R., Rodriguez J.M. and Xaus J., Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. // Journal of Applied Microbiology. 2006, 101, p. 72-79.
- 136.** Owen C.G., Martin, R.M., Whincup, P.H., Smith, G.D. and Cook D.G., Does breastfeeding influence risk of type 2 diabetes in later life? A quantitative analysis of published evidence. // American Journal of Clinical Nutrition. 2006, Vol. 84, p. 1043-1054.
- 137.** Pant et al. Probiotics and Prebiotics in Food. // Nutrition and Health. 1996, p. 10-11.
- 138.** Patel S., Goyal A., Applications of Natural Polymer Gum Arabic: A Review. // International Journal of Food Properties. 2015, Vol. 18, p. 986-998.

- 139.** Perez P.F., Doré J., Leclerc M., Levenez F., Benyacoub J., Serrant P., Segura- Roggero I., Schiffrin E.J., Donnet-Hughes A., Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? // *Pediatrics*. 2007, Vol. 119, p. 724–32.
- 140.** Perez-Caro F.J., H. Dong and P. Yaqoob In vitro immunomodulatory activity of *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 and *Lactobacillus salivarius* CECT 5713: two probiotic strains isolated from human breast milk. // *Immunobiology*. 2010, Vol. 215, p. 996-1004.
- 141.** Penders J., Thijs G., Vink G., Stelma F.F., Snijeders B., Kummeling I. vanden Brandt P.A., Stobberingh E. E., Factors Influencing the Composition the Intestinal Microbiota in Early Infancy. // *Pediatrics*. 2006, Vol. 118, p. 511-520.
- 142.** Petherick A., Development: mother's milk: a rich opportunity. // *Nature*, 2010, Vol. 468, p. 5–7.
- 143.** Picciano M.F., Nutrient composition of human milk. // *Pediatr Clin. North. Am.* 2001, Vol. 48, p.53-67.
- 144.** Prakash S. and Jones M.L., Artificial cell therapy: New strategies for the therapeutic delivery of live bacteria. // *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2005, Vol. 1, p. 44-56.
- 145.** Prentice A., Regional Variations in the Composition of Human Milk. In: Jensen, RG. Editor. *Handbook of Milk Composition*. // Academic Press, Inc.; San Diego, CA. 1995, p. 919.
- 146.** Ramsay D.T., Kent J.C., Owens R.A., Hartmann P.E., Ultrasound imaging of milk ejection in the breast of lactating women. // *Pediatrics*. 2004, Vol. 113, p.361–367.
- 147.** Raul Cabrera-Rubio, Carmen Collado M., Laitinen K., Salminen S., Erika Isolauri, and Alex Mira, The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. // *Am. J. Clin. Nutr.* 2012, Vol. 96, p. 544–51.
- 148.** Roozbeh L.N., Tabatabaie F., Alaeddini B., Noorbakhsh R. and al. Investigation of lactobacilli from mother's breast milk who were placed on probiotic diet. // *African Journal of Microbiology Research*. 2011, Vol. 5/13, p. 1581-1585.
- 149.** Rodríguez J. M. The Origin of Human Milk Bacteria: Is There a Bacterial Entero-Mammary Pathway during Late Pregnancy and Lactation? // *Advances in Nutrition, American Society for Nutrition. Adv.* 2014, Vol. 5, p. 779–784.

- 150.** Rescigno M., Urbano M., Valzasina B., Francolin M., Rotta G., Bonasio R., Granucci F., Kraehenbuhl J., Ricciardi-Castagnoli P., Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. // Nat. Immunol. 2001, Vol. 2, p. 361–367.
- 151.** Reuter G., The *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* microbiota of the human intestine: composition and succession. // Curr. Issues Intest. Microbiol. 2001, Vol. 2, p.43-53.
- 152.** Reviriego C., Eaton T., Martín R., Jiménez E., Fernández L., Gasson M.J. and Rodríguez J.M., Screening of virulence determinants in *Enterococcus faecium* strains isolated from breast milk. // Journal of Human Lactation. 2005, Vol. 1/2, p. 131-137.
- 153.** Roger L.C., Costabile A., Holland D.T., Hoyles L., Mc Cartney A.L., Examination of faecal *Bifidobacterium* populations in breast- and formula-fed infants during the first 18 months of life. // Microbiology. 2010, Vol. 156, p. 3329–3341.
- 154.** Saavendra J.M., Probiotic agents: clinical applications in infants and children In: Raïha NCR and Rubaltelli F.F., (Eds) Infant Formula: // Closer to Reference, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2002, p. 15–27.
- 155.** Schack-Nielsen L., Larnkjaer A. and Michaelsen K.F., Long term effects of breastfeeding on the infant and mother. //Advances in Experimental Medicine and Biology. 2005, Vol. 569, p. 16-23.
- 156.** Schiffrin E.J., Rochat, F., Link-Amster H., Aeschlimann J.M. and Donnet-Hughes A., Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. // J. Dairy Sci. 1995, Vol. 78, p. 491–497.
- 157.** Shoaf K., Mulvey G.L., Armstrong G.D., Hutkins R.W., Prebiotic galactooligosaccharides reduce adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to tissue culture cells. // Infect Immun. 2006, Vol. 74/12, p. 6920–6928.
- 158.** Schrezenmeir J. and Vrese M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics – approaching a definition. // Am. J. Clin.Nutr. 2001, Vol. 73, p. 361S-364S.
- 159.** Sela M., Pirim C., Locascio R.G., Freeman S.L., et al. Glycoprofiling bifidobacterial consumption of galacto-oligosaccharides by mass spectrometry reveals strain-specific, preferential consumption of glycans. // Appl. Environ. Microbiol. 2009, Vol. 75, p. 7319–7325.
- 160.** Sinkiewicz G., Occurrence of *Lactobacillus reuteri* in human breast milk: // Microbial Ecology in Health and Disease. 2008, Vol. 20, p. 122-126.

- 161.** Solis G., De Los Reyes-Gavilan C.G., Fernandez N., Margolles A. and Gueimonde M., Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut. // *Anaerobe*. 2010, Vol. 16, p. 307-310.
- 162.** Stockinger S., Hornef M.W., Chassin C. Establishment of intestinal homeostasis during the neonatal period. // *Cell Mol Life Sci*. 2011, Vol. 68, p. 3699–3712.
- 163.** Stuebe A., The risks of not breastfeeding for mothers and infants. // *Reviews in Obstetrics and Gynecology*. 2009, Vol. 2, p. 222-231.
- 164.** Susan M., LaTuga, Alison S., Patrick C. S., Source and Function of Microbiota in Breast Milk. // *Seminars in Reproductive Medicine*. 2014, p. 68-73.
- 165.** Schillinger U., Yousif N.M., Sesar L., Franz C.M., Use of group-specific and RAPD PCR analyses for rapid differentiation of *Lactobacillus* strains from probiotic yogurts. // *Curr. Microbiol*. 2003, Vol. 47, p. 453-456.
- 166.** Schack-Nielsen L., Larnkjaer A. and Michaelsen K.F., Long term effects of breastfeeding on the infant and mother. // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2005, Vol. 569, p. 16-23.
- 167.** Szajewska H., Gyrzuk E. and Horvath A., *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 for the management of infantile colic in breastfed infants: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. // *Journal of Pediatrics*. 2015, Vol. 166/1, p.74–78
- 168.** Torres D.P., Goncalves M.D., Teixeira J.A., Rodrigues L.R., Galacto-oligosaccharides: production, properties, applications, and significance as prebiotics. // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2010, Vol. 9. p. 438–454.
- 169.** Vaningelgem F., Zamfir M., Adriany T., De Vuyst L. // *J. Appl. Microbiol*. 2004, Vol. 97. p. 1257-1273.
- 170.** Vazquez-Torres A., Jones-Carson J., Baumler A.J., Falkow S., Valdivia R., Brown W., Le M., Berggren R., Parks W.T., Fang F.C., Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18- expressing phagocytes. // *Nature*. 1999, Vol. 401, p. 804–808.
- 171.** Walker A. Breast milk as the gold standard for protective nutrients. // *J. Pediatr*. 2010, Vol. 156, p. 3-7.
- 172.** Wang B., Brand-Miller J. The role and potential of sialic acid in human nutrition. // *Eur. J. Clin. Nutr*. 2003, Vol. 57/11, p.1351-69.

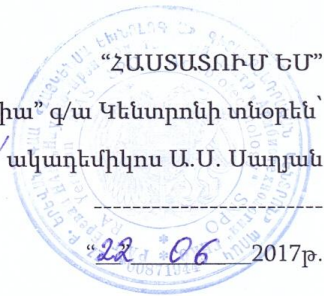
- 173.** Weizman Z., Asli G., Alsheikh A. Effect of a probiotic infant formula on infections in child care centers: comparison of two probiotic agents. // *Pediatrics*. 2005, Vol. 115, p. 5-9.
- 174.** World Health Organization (WHO), *Mastitis: causes and management*. Geneva, 2000, Switzerland: WHO.
- 175.** Willem M. De Vos., Engstrand L., Drago L., Reid G., Schaubert J., Hay R., Mendling W., Schaller M., Spiller R., Gahan C.G., Rowland I., *Human microbiota in health and disease*. // *Self. Care*. 2012, Vol. 3, p.1-68.
- 176.** Yang F., Zeng X., Ning K., Liu K.L., Lo C.C., Wang W., Chen J., Wang D., Huang R., Chang X., et al. Saliva microbiomes distinguish caries-active from healthy human populations. // *ISME J*. 2012, Vol. 6, p. 1–10.
- 177.** Zivkovic A.M., German J.B., Lebrilla C.B., Mills D.A., *Human milk glycobioime and its impact on the infant gastrointestinal microbiota*. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2011, Vol. 108, p. 4653–4658.
- 178.** Банникова А. Л., Королева Н.С., Семенихина В.Ф., *Микробиологические основы молочного производства*. // *Агропромиздат*, Москва, 1987, с. 400.
- 179.** Герхардт Ф., *Методы общей бактериологии*. // *Мир*, Москва, 1983, т.1., с. 67.
- 180.** Егорова Н. С., *Практикум по микробиологии*. // *Издательство Московского Университета*. Москва, 1976, с.307
- 181.** Лабинская А.С., *Микробиология с техникой микробиологических исследований*. // *Медицина*, 1978, с. 62-63.
- 182.** Попов В.Н., Машкина О. С. *Принципы и основные методы генетической инженерии*. // *Учебное пособие*. 2009.
- 183.** Չիչոյան Ն.Բ., Հայաստանի տարբեր մարզերից մթերված ծիրանենիների կամեդների (*gummi armeniaceae*) ապրանքագիտական վերլուծությունը. // *Հայաստանի բժշկագիտություն*, Դ. LIV, № 2, 2014, էջ 54-61.

3046L 406 1

ՀՀ ԳԱԱ “Հայկենսատեխնոլոգիա” գ/ա Կենտրոնի տնօրեն՝

Blum

ակադեմիկոս Ա.Ս. Սադյան



ՏԵՂԵԿԱՆՔ

ՀՀ ԳԱԱ “Հայկենսատեխնոլոգիա” գիտաարտադրական Կենտրոնի
“Մանրէների ավանդադրման կենտրոն” հիմնարկում շտամների ավանդադրման
վերաբերյալ

Սույն տեղեկանքը տրված է առ այն, որ 2017թ. հունիսի 08-ին “Մանրէների ավանդադրման կենտրոն” հիմնարկը (ՄԱԿ) ավանդադրման նպատակով ընդունել է ՀՀ ԳԱԱ “Հայկենսատեխնոլոգիա” ԳԱԿ-ի “Մանրի կենսաանվտանգության լաբորատորիայի” գիտական ղեկավարի կ.գ.դ., պրոֆեսոր Հրաչյա Հովհաննիսյանի և Լուսինե Դանիելյանի կողմից ներկայացված շտամներ՝ *Lactobacillus fermentum* LH15, *L. casei* LH25, *L. salivarius* LH27, *L. reuteri* LH32, *Lactococcus lactis* LH38 և *Streptococcus thermophilus* LH44, անհրաժեշտ փաստաթղթերով:

Ավանդադրված շտամներին ՄԱԿ-ում տրվել են համապատասխան շիֆրեր և համարներ՝ *Lactobacillus fermentum* LH15 – MDC 9643, *L. casei* LH25 – MDC 9644, *L. salivarius* LH27 – MDC 9645, *L. reuteri* LH32 – MDC 9646, *Lactococcus lactis* LH38 – MDC 9647, *Streptococcus thermophilus* LH44 – MDC 9648:

Համաձայն սահմանված կարգի, շտամների փոխանցումն այլ կազմակերպությունների կամ ֆիզիկական անձանց, ինչպես նաև դրանց օգտագործումն առևտրային և արտադրական նպատակներով թույլատրվում է միայն հատուկ գրավոր թույլտվության առկայության դեպքում:

Հիմք՝ ՀՀ ԳԱԱ “Հայկենսատեխնոլոգիա” ԳԱԿ-ի “Մանրի կենսաանվտանգության լաբորատորիայի” գիտական ղեկավարի Հրաչյա Հովհաննիսյանի 2017թ. հունիսի 08-ի դիմումը:

ՄԱԿ-ի ղեկավար

h. Davtyan

Հ. Զարգարյան

ՄԱԿ-ի Գովտորանների Հավաքածուի ղեկավար

h. Davtyan

Մ. Կինոսյան

ՀԱՎԵԼ ՎԱՃ 2

ՓՈՐՁԱՐԿՈՒՄՆԵՐԻ ԱՐՅՈՒՆՔՆԵՐԸ

Target	Primers and probes	Sequence (5'-3')	Tm(°C)	% GC	BLAST ID number	Amplicon length (bp)
<i>L. casei</i>	F_case_1S	CTA TAA GTA AGC TTT GAT CCG GAG ATT T	59	36	1037022798-023495-2136	132
	R_case_1S	CTT CCT GCG GGT ACT GAG ATG T	59	55	1037022917-024843-29627	
	P_case_1S	ACA AGC TAT GAA TTC ACT TGC	70	38	1037022752-023005-20772	
<i>L. delbrueckii</i>	F_dclb_1S	CAC TTG TAC GTT GAA AAC TGA ATA TCT TAA	58	30	1089018504-4206-64529811906	94
	R_dclb_1S	CGA ACT CTC TCG GTC GCT TT	58	55	1089018475-6841-166657768151	
	P_dclb_1S	CCG AGA ATC ATT GAG ATC	68	44	1089018437-6309-163988227498	
<i>L. fermentum</i>	F_ferm_1S	AAC CGA GAA CAC CGC GTT AT	58	50	1036676682-09669-23287	88
	R_ferm_1S	ACT TAA CCT TAC TGA TCG TAG ATC AGT CA	58	38	1036676709-010209-2351	
	P_ferm_1S	TAA TCG CAT ACT CAA CTA A	68	32	1036676736-010547-20717	
<i>L. reuteri</i>	F_reut_1S	ACC GAG AAC ACC CGG TTA TTT	59	48	1089025339-29395-129280047216	93
	R_reut_1S	CAT AAC TTA ACC TAA ACA ATC AAA GAT TGT CT	59	28	1089025385-30347-37558232754	
	P_reut_1S	ATC GGT AAC TCA ATT AAT	69	28	1089025413-30287-26112845854	
<i>Lactobacillus salivarius</i>	F_saliv_1S	GTC GT A ACA AGG TAG CCG TAG GA	97	77	201710254208-84278137138-9398229	94
	R_saliv_1S	TAA ACA AAG TAT TCG ATA AAT GTA CAG GTT	97	84	201710252208-027813538-9399776	
	P_saliv_1S	GCA AAC CGG GTT ACA TAC CGT	84	77	201710412541-065213228-7452311	
<i>Lactobacillus spp.</i>	F_rham_1S	CCT GCA CAC ACG AAA	69	55	1023708453-011313-6655	
	F_allact_1S	TGG ATG CCT TGG CAC TAG GA	58	55	1024485925-024664-30598	92
	R_allact_1S	AAA TCT CCG GAT CAA AGC TTA CTT AT	58	35	1024478788-024701-16287	
All bacteria	P_allact_1S	TAT TAG TTC CGT CCT TCA TC	68	40	1024478009-017753-28422	
	F_eub	TCC TAC GGG AGG CAG CAGT	59	-	-b	466a
	R_eub	GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT	58	-	-b	
	P_eub	CGT ATT ACC GCG GCT GCT GGC AC	70	-	-b	

ԵԶՐԱԿԱՑՈՒԹՈՒՆ.

№	Название	P/N		Species		BKO		ВПК		Вывод	Действие
		Ct/SybrGreen		Ct(Hex)Yellow		Ct(FAM)		Ct Bac.			
0	ПКО-C1	21.44	+	30.71	+	29.67	+	29.81	+	Принимается	-
0	ОКО C1	>=50	-	>=50	-	>=50	-	29.77	+	Принимается	-
1	1	21.14	+	30.14	+	22.76	+	28.79	+	<i>L. delbrueckii</i>	94/95%
2	2	22.52	-	32.41	+	36.73	+	44.11	-	<i>L. fermentum</i>	97/99%
3	3	42.18	-	31.57	-	24.31	+	21.64	+	<i>L. casei ssp. sakei</i>	99/100%
4	4	14.36	+	30.67	+	22.97	+	23.59	+	<i>L. casei</i>	100%
5	5	15.73	+	44.57	-	28.64	+	22.49	+	<i>L. salivarius</i>	81/98%
6	6	13.47	+	35.47	+	27.12	-	23.37	+	<i>L. casei</i>	93%
7	7	22.75	+	32.14	+	34.97	-	22.87	+	<i>L. casei</i>	99%
8	8	18.56	+	33.76	-	38.17	-	24.38	+	<i>L. reuteri</i>	84/95%
9	ВПК-AM	22.89	+	29.87	+	>=50	-	21.75	+	Принимается	89/94%
10	ВПК-CS	24.12	+	20.96	+	22.7	+	22.86	+	Принимается	-

* Լրացվում է այն դեպքում, երբ փորձարկումները կատարվում են փորձարկման լաբորատորիայի տարածքից դուրս:

** Լրացվում է այն դեպքում, երբ փորձարկումների արդյունքները բացասական են:

*** Փորձարկման արդյունքները տարածվում է միայն ներկայացված նմուշին:

**** Հաշվի է առնվում չափման անորոշությունը: Այս ցուցանիշը լրացվում է ըստ անհրաժեշտության:

***** Օգտահանման կամ ոչնչացման եղանակները, պայմանները:

Արձանագրությունը կազմված է _____ 2 _____ էջից/ _____ 3 _____ օրինակ/

Պատասխանատու կատարողներ

ՓԼ-ի ղեկավար՝

Ս. Ավագյան
ստորագրություն
անունը, ազգանունը
Կ. Դարբինյան
ստորագրություն
անունը, ազգանունը

Սույն փորձարկման արձանագրությունը չի կարելի մասնակիորեն արտատպել կամ վերարտադրել:

ԿԹԲ - Կաթնաթթվային բակտերիա

ԼԲ - Լակտոբացիլ

ԼԿ - Լակտոկոկ

ՕԽ - Օպտիկական խողովակ

ՊԲ - Պրոբիոտիկ բակտերիաներ

ՊԾՌ - Պոլիմերազային շղթայական ռեակցիա

ՕԾ - օլիգոնուքլեոտիդ

ԳՕԾ - Գալակտոօլիգոնուքլեոտիդ

ԳԱՄ - Գաղութառաջացնող միավոր

ՖՕԾ – Ֆրոկտոօլիգոնուքլեոտիդ

RAPD - Պոլիմորֆ ԴՆԹ-ի պատահական ամպլիֆիկացիա

ՄԿՕԾ - Մայրական կաթի օլիգոնուքլեոտիդ

Սինբիոտիկ - պրոբիոտիկ + պրեբիոտիկ