

ՀՀ ԳԱԱ «ՀԱՅԿԵՆՍԱՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱ» ԳԱԿ ՊՈԱԿ

ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ ԿԱՐԻՆԵ ՎԻԿՏՈՐԻ

Պրոբիոտիկ կաթնաթթվային բակտերիաների ադիեզիան որպես ադեստամոքսային համակարգի բնականոն միկրոբիոտայի կարգավորիչ գործոն

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

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ-2016

НПЦ «АРМБИОТЕХНОЛОГИЯ» НАН РА ГНКО

АРУТЮНЯН КАРИНЕ ВИКТОРОВНА

Адгезия пробиотических молочнокислых бактерий как регулирующей фактор
нормальной микробиоты желудочно-кишечного тракта

АВТОРЕФЕРАТ

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

ЕРЕВАН-2016

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ԵՊՀ կենսաբանության ֆակուլտետում:

Գիտական ղեկավար՝

ՀՀ ԳԱԱ թղթակից անդամ,
կ.գ.դ., պրոֆեսոր Ա. Հ. Թռչունյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝

կ.գ.դ., պրոֆեսոր. Ս. Մ. Բադալյան
կ.գ.թ., Կ. Վ. Չիտչյան

Առաջատար կազմակերպություն՝

Հայաստանի ազգային ագրարային
համալսարան

Ատենախոսությունը տեղի կունենա 2016 թ. դեկտեմբերի 23-ին, ժամը 15⁰⁰-ին, ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում գործող ՀՀ ԲՈՀ-ի Կենսատեխնոլոգիայի 018 մասնագիտական խորհրդի նիստում:

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

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա»

ԳԱԿ-ի գրադարանում:

Ատենախոսության սեղմագիրն առաքված է 2016 թ. նոյեմբերի 23-ին:

Մասնագիտական խորհրդի գիտ. քարտուղար,
կ.գ.թ.

Գ. Ե. Ավետիսովա

Тема диссертации утверждена на биологическом факультете ЕГУ.

Научный руководитель:

член-корреспондент НАН РА,
д.б.н., профессор А. А. Трчунян

Официальные оппоненты:

д.б.н., профессор С. М. Бадалян
к.б.н., К. В. Читчян

Ведущая организация

Национальный аграрный университет
Армении

Защита диссертации состоится 23 декабря 2016 г. в 15⁰⁰ часов на заседании специализированного совета 018 Биотехнологии ВАК РА при НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА.

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

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

Автореферат разослан 23 ноября 2016 г.

Ученый секретарь специализированного совета,
к.б.н

Г. Е. Аветисова

ԱՇԽԱՏԱՆՔԻ ԸՆԴՀԱՆՈՒՐ ԲՆՈՒԹԱԳԻՐԸ

Թեմայի արդիականությունը: Վերջին տարիներին նկատվում է հարաճուն հետաքրքրություն այսպես կոչված գործառության սննդամթերքների նկատմամբ: Համարվում է, որ նման սննդամթերքների օգտագործումը նվազեցնում է մի շարք քրոնիկական հիվանդությունների առաջացման հավանականությունը, ինչպես նաև հնարավոր վարակային հիվանդությունների զարգացումը (Azyz et al., 2012): Նման սննդամթերքների դասին են պատկանում պրոբիոտիկները և պրեբիոտիկները, որոնք ոչ միայն նվազեցնում են զանազան հիվանդությունների առաջացման հավանականությունը, այլ նաև նպաստում են օրգանիզմի իմունային համակարգի, դիմադրողականության բարձրացմանը (Pepoyan & Trchounian, 2009): Պրոբիոտիկ կաթնաթթվային բակտերիաների (ԿԹԲ) օգտագործումը բարելավում է մարսողական համակարգի գործունեությունը, նվազեցնում աղիների պատի թափանցելիությունը՝ խոչընդոտելով ախտածին միկրոօրգանիզմների թափանցմանը ներս (Song et al., 2015): Բացի ընդունված կենսաբանական, կենսաքիմիական և ֆիզիկոքիմիական հատկություններից կարևոր նշանակություն ունի նաև կաթնաթթվային պրոբիոտիկ բակտերիաների ադիեզիայի հատկությունը՝ ընդունակությունը ամրանալու, պահպանվելու և բնակվելու մարսողական համակարգի լորձաթաղանթում: Միկրոօրգանիզմների ադիեզիան աղետամոքսային համակարգի էպիթելիային բջիջների մակերեսին հանդիսանում է հաջող նախապայման նրանց հետագա գաղութացման և մի շարք կարևոր կենսական գործառույթների իրականացման համար (Tremaroli & Bäckhed, 2012): Վարակային հիվանդությունների զարգացման առաջին փուլ է հանդիսանում լիզանդ-ռեցեպտորային փոխազդեցությունը, որը պայմանավորված է միկրոօրգանիզմների ադիեզիայով մակրոօրգանիզմի զգայուն բջիջներին: Հետևաբար ԿԹԲ ադիեզիայի ուժեղությունը աղիքային էպիթելիային բջիջներին ունի որոշիչ նշանակություն ախտածին միկրոօրգանիզմների դեմ պայքարում կիրառվող պրոբիոտիկների արդյունավետության համար (Pepoyan & Trchounian, 2009): Այսպիսով բժշկության և կենսատեխնոլոգիայի կարևորագույն խնդիրներից է բարձր ադիեզիայի հատկությամբ օժտված պրոբիոտիկ ԿԹԲ շտամների անջատումը (Воробєєв и т.д., 2006): Սակայն անհրաժեշտ է ընտրել կաթնաթթվային պրոբիոտիկ բակտերիաների այնպիսի շտամներ, որոնք արտահայտված ադիեզիայի հատկության հետ միաժամանակ կցուցաբերեն նաև կայունություն արտաքին վնասակար նյութերի ազդեցության պայմաններում: Այդպիսի նյութեր կարող են հանդիսանալ սննդի միջոցով օրգանիզմ ներթափանցած պահպանիչները, նիտրատները, հակաբիոտիկները, պեստիցիդները, հերբիցիդները և այլն: Ելնելով վերոհիշյալից՝ կարևոր է աղիների տրանսլոկացիան պրոբիոտիկ կաթնաթթվային և բիֆիդոբակտերիաներով, ինչը կնպաստի աղիների բնականոն միկրոէկոլոգիայի՝ միկրոբիոտայի ձևավորմանը: (Hsiao et al., 2013):

Այդ պատճառով հետաքրքիր էր ուսումնասիրել և ընտրել արտահայտված ադիեզիայի հատկությամբ օժտված պրոբիոտիկ ԿԹԲ շտամներ, որոնք կպահպանեն իրենց հատկությունները մի շարք անցանկալի նյութերի

ազդեցության ներքո՝ դրանով իսկ նպաստելով բնականոն աղիքային միկրոբիոտայի ձևավորմանը: Ինչպես կանխարգելիչ, այնպես էլ բուժման նպատակներով ընտրել արդյունավետ ԿԹԲ շտամներ և հիմնավորել նրանց ազդեցությունը կենսաբիոտայի ախտածին միկրոօրգանիզմների զարգացումը կանխելու և նրանց կողմից արտադրած տոքսինները չեզոքացնելու գործում:

Ուսումնասիրության նպատակներն ու խնդիրները: Տվյալ աշխատանքի նպատակն էր ուսումնասիրել ԿԹԲ աղիեզիայի հատկությունը, ինչպես նաև տարբեր խտության ընկճող նյութերի կիրառման պայմաններում նրանց կենսունակության և աղիեզիայի հատկության փոփոխությունները:

Հետազոտությունների համար սահմանվել են հետևյալ խնդիրները՝

1. Ուսումնասիրել տարբեր խտության նիտրատների (NaNO_3 , KNO_3), պահպանիչների (սորբինաթթու), հակաբիոտիկների (լևոմիցետին, էրիթրոմիցին, էնտերոֆուրիլ) ազդեցությունը ԿԹԲ տարբեր ցեղերին պատկանող շտամների կենսունակության, թթու առաջացման և կենսաթաղանթների գործառական ակտիվության վրա:
2. Ուսումնասիրել ԿԹԲ հակաբակտերիական ակտիվությունը: Ներկայացնել պայմանական ախտածին էնտերոբակտերիաների և պրոբիոտիկ ԿԹԲ աղիեզիվության համեմատական գնահատումը:
3. Ուսումնասիրել տարբեր խտության նիտրատների (0,5-2%) առկայության պայմաններում մակարդված ԿԹԲ շտամների աղիեզիայի հատկությունը, մշակել միջոցներ՝ կանխելու կենսացենոզում նիտրատների տրանսֆորմացիան նիտրիտների և նիտրոզոամինների:
4. Բացահայտել տարբեր խտության նիտրատների (0,5-2%), ինչպես նաև նիտրատների և N,N'-դիցիկլոհեքսիլկարբոդիմիդի (ԴՑԿԴ) զուգակցված ազդեցությունը *Lactobacillus acidophilus* Ep 317/402 «Նարինե» շտամի թաղանթային բշտիկներում ԱԵՖ-ազային ակտիվության վրա աճման միջավայրի pH 6.5-ի պայմաններում:
5. Ուսումնասիրել տարբեր խտության (0.001-0.004%) տարատեսակ հակաբիոտիկների ազդեցությունը ԿԹԲ աղիեզիայի հատկության վրա և բացահայտել լակտոբացիլների ու ստրեպտոկոկների կենսունակության և աղիեզիայի առանձնահատկությունները այդ նյութերի առկայության պայմաններում:
6. Որոշել տարբեր խտության (0,2-2%) պահպանիչների (սորբինաթթու) կիրառման պայմաններում ԿԹԲ կենսունակության և աղիեզիայի հատկության փոփոխությունները:
7. Ընտրել նիտրատների, հակաբիոտիկների, պահպանիչների առկայության պայմաններում բարձր աղիեզիայի հատկությամբ օժտված ԿԹԲ շտամներ, որոնք կարող են կիրառվել կաթնարդյունաբերության տարբեր բնագավառներում, դեղագործական ոլորտում, բժշկության մեջ՝ աղեստամոքսային հիվանդությունների հարուցիչների զարգացումը ճնշելու և նիտրատների տրանսֆորմացիան կենսացենոզում կանխարգելու համար, կենսատեխնոլոգիայի բնագավառում:

Աշխատանքի գիտական նորոյթն ու գիտագործնական նշանակությունը: Տվյալ աշխատանքի ընթացքում ուսումնասիրվել է տարբեր ցեղերին պատկանող

պրոբիոտիկ ԿԹԲ ադիեզիայի հատկությունը մարդու, խոշոր և մանր եղջերավոր կենդանիների արյան կարմիր բջիջների հեմագլոտինացիայի ռեակցիայի միջոցով: Առանձնացվել են արտահայտված ադիեզիայի հատկությամբ ԿԹԲ շտամներ, որոնք միաժամանակ օժտված են նաև բավականին բարձր հակաբակտերիական ազդեցությամբ մի շարք ախտածին միկրոօրգանիզմների նկատմամբ, ինչը հեռանկարային է դարձնում լակտոբակտերիաների կիրառությունը բժշկության մեջ՝ աղեստամոքսային և վարակային հիվանդությունների բուժման ժամանակ: Այս երկու հատկությունների միաժամանակյա դրսևորումը էլ ավելի արժեքավոր է դարձնում ԿԹԲ հիման վրա ստացված մերանների կիրառումը արտադրական և բժշկական ոլորտներում: Բազմաթիվ հեղինակների կողմից ուսումնասիրվել է պրոբիոտիկ ԿԹԲ ադիեզիայի հատկությունը տարբեր էպիթելային բջիջների վրա, ինչպիսիք են Caco-2 կամ Hela բջիջները, սակայն էրիթրոցիտների վրա կատարված հետազոտությունները գրականության մեջ սակավաթիվ են և կարելի է ասել դրանում է կայանում կատարված աշխատանքի նորոյթը և դժվարությունը: Առաջին անգամ ուսումնասիրվել է *L. acidophilus* Ep 317/402 «Նարինե» շտամի ադիեզիայի հատկությունը ընկճող նյութերի ազդեցությամբ՝ հեմագլոտինացման ռեակցիայի շնորհիվ: Կարևոր նշանակություն ունի աղիների հիմնային pH-ում ԿԹԲ ակտիվության պահպանումը: pH 8-ի պայմաններում *L. acidophilus* Ep 317/402 «Նարինե» շտամը պահպանել է կենսունակությունը և ադիեզիայի հատկությունը: Հաշվի առնելով հակաբիոտիկների լայն կիրառումը սննդի արդյունաբերության և ժամանակակից բժշկության մեջ՝ արդիական խնդիր է հանդիսանում հակաբիոտիկների նկատմամբ կայուն ԿԹԲ շտամների անջատումը, որոնք կպահպանեն իրենց կենսունակությունը և ադիեզիայի հատկությունը տվյալ նյութերի առկայությամբ: Տարբեր խտության (0.001-0.004%) հակաբիոտիկների (լևոմիցետին, էրիթրոմիցին, էնտերոֆոլի) առկայության պայմաններում ԿԹԲ ադիեզիայի հատկության նվազումը ուղիղ համեմատական է հակաբիոտիկների խտության բարձրացմանը: Դա ունի կարևոր նշանակություն, քանի որ խտության բարձրացմանը զուգընթաց մեծանում է հակաբիոտիկի նկատմամբ բակտերիաների զգայունությունը, հետևաբար նվազում է նաև ադիեզիայի միջավայրում կայունության գենետիկական հիմքերի հորիզոնական տեղափոխման հավանականությունը: Միաժամանակ ընկնում է ԿԹԲ թթվազոյացման էներգիան, որը ևս համարվում է կարևոր գործոն հատկապես կաթնամթերքների արտադրության ժամանակ՝ վերջիններիս օրգանոլեպտիկ հատկությունների պահպանման համար: *L. acidophilus* Ep 317/402 «Նարինե» շտամի կայունությունը նիտրատների և սորբինաթթվի բարձր խտությունների նկատմամբ հնարավորություն է տալիս սննդի ընդունման ժամանակ որոշ չափով չեզոքացնել սննդում առկա նյութերից ստացված վնասի աստիճանը և մշակել միջոցներ՝ կանխելու միկրոբիոտայում նիտրատների տրանսֆորմացիան նիտրիտների և նիտրոզոամինների:

Պաշտպանությանը ներկայացվող հիմնական դրույթները:

1. Նիտրատների, պահպանիչների, հակաբիոտիկների և pH-ի տարբեր արժեքների ազդեցությունը հետևյալ ցեղերին պատկանող տեսակների՝ *L.*

acidophilus, *L. delbrueckii* var. *bulgaricus* var. *mazuni*, *L. jugurtii*, *S. lactis*, *S. thermophilus* (5 շտամ) խմորման ուժգնության և աղիեզիայի հատկության վրա:

2. Պայմանական ախտածին էնտերոբակտերիաների և պրոբիոտիկ ԿԹԲ աղիեզիվության համեմատական գնահատումը CFA I (CFA-colonization factors antigens) և CFA II աղիեզիվության գործոնների միջոցով:

3. *L. acidophilus* Ep 317/402 «Նարինե» շտամի աղիեզիայի հատկությունը հակաբակտերիական ակտիվության և նիտրատների նկատմամբ կայունության ապահովման մեջ:

Հեղինակի անձնական ներդրումը: Հեղինակի անձնական ներդրումը ներառում է առաջին անգամ ընկճող նյութերի (հակաբիոտիկներ, նիտրատներ, պահպանիչներ) ազդեցությամբ ԿԹԲ աղիեզիայի հատկության համեմատական վերլուծության իրականացումը, ձևակերպված խնդիրների փորձնական իրականացումը, գիտական հոդվածների և առենախոսության ձևակերպումը: Հետազոտությունների արդյունքները քննարկվել, իսկ հիմնական մեթոդները մշակվել են գիտական ղեկավար, ՀՀ ԳԱԱ թղթակից անդամ, կ.գ.դ., պրոֆ. Ա. Հ. Թոչուկյանի և առաջատար գիտաշխատող՝ կ.գ.դ. Լ. Հ. Հակոբյանի ու ք.գ.թ. Ն. Մ. Հարությունյանի հետ համատեղ:

Աշխատանքի ապրոբացիան: Առենախոսության արդյունքները զեկուցվել են ԵՊՀ Կենսաբանության ֆակուլտետի Կենսաքիմիայի, մանրէաբանության և կենսատեխնոլոգիայի ամբիոնում, ինչպես նաև «Биофарма-2010 от науки к промышленности» միջազգային կոնֆերանսում (Ереван 17-20 мая 2010 г.), Երիտասարդ գիտնականների 2-րդ միջազգային գիտաժողովում «Երիտասարդների ավանդը կենսատեխնոլոգիայի զարգացման գործընթացում» (Երևան, հոկտեմբերի 1-4, 2013 թ.), 50th FEBS Congress “From Molecular Mechanisms to Cellular Functions” (Paris, France, 30 August - 4 September, 2014), Երիտասարդ գիտնականների 3-րդ միջազգային գիտաժողովում «Երկխոսություն գիտության մասին» (Երևան, հունիսի 23-26, 2015 թ.) և The 6th Congress of European Microbiologists (FEMS) (Maastricht, The Netherlands, 7-11 June, 2015):

Հրատարակված աշխատություններ: Առենախոսության արդյունքները ներկայացված են 15 հրատարակումներում, այդ թվում՝ 7 միջազգային և տեղական գիտական ամսագրերում հոդվածների ձևով և 8 միջազգային գիտաժողովների թեզիսների ժողովածուներում:

Աշխատանքի իրականացման վայրը: Աշխատանքը իրականացվել է ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի Կաթնաթթվային բակտերիաների և շաքարասնկերի լաբորատորիայում, ԵՊՀ Կենսաքիմիայի, մանրէաբանության և կենսատեխնոլոգիայի ամբիոնում: Հիմնական մեթոդի մշակումն իրականացվել է ՀՀ ԱՆ Ա. Բ. Ալեքսանյանի անվան համաճարակաբանության, վիրուսաբանության և բժշկական մակաբուժաբանության գիտահետազոտական ինստիտուտի հետ համատեղ:

Առենախոսության ծավալը և կառուցվածքը: Աշխատանքը կազմված է ներածությունից, գրական ակնարկից, հետազոտությունների նյութերից և մեթոդներից, հետազոտությունների արդյունքներից և դրանց քննարկումից, ամփոփումից, եզրակացություններից և գրականության ցանկից: Աշխատանքը

շարադրված է 133 էջի վրա, ներառում է 9 աղյուսակ, 17 նկար և 263 գրական հղում:

ԳՐԱԿԱՆ ԱՎՆԱՐԿ

Գրական ակնարկը կազմված է 9 բաժիններից, որտեղ ներկայացված են ԿԹԲ ընդհանուր բնութագիրը և տարածվածությունը, դասակարգումը և նյութափոխանակության հիմնական ուղիները: Նկարագրված են *L. acidophilus* տեսակի ընդհանուր բնութագիրը, պրոտոնային ԱԵՖազի կառուցվածքը և գործառույթային նշանակությունը: Ներկայացված են հակաբիոտիկների, նիտրատների և պահպանիչների ընդհանուր բնութագիրը, դասակարգումը, ազդեցության մեխանիզմները, ինչպես նաև ԿԹԲ ադիեզիան աղիքային լորձաթաղանթին, ադիեզիայի մեխանիզմները ու ադիեզինների տեսակները:

ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՆՅՈՒԹԵՐԸ ԵՎ ՄԵԹՈԴՆԵՐԸ

Հետազոտության օբյեկտները: Աշխատանքում օգտագործվել են ավանդադրված ԿԹԲ 5 շտամներ՝ *L. acidophilus* Ep 317/402 «Նարինե» (ՄԴԸ-9602), *L. delbrueckii subsp. bulgaricus var. mazuni* «Կարինե» (ՄԴԸ-9603), *L. jugurti* 11111 (ՄԴԸ-9606), *Streptococcus lactis* 1304 (ՄԴԸ-9607) և *Streptococcus thermophilus* M7 (ՄԴԸ-9608), որոնք տրամադրվել են ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի Մանրէների ավանդադրման կենտրոն հիմնարկի կողմից:

ԿԹԲ աճեցումը և երկարատև պահպանումը: ԿԹԲ պահպանվել են յուղազրկված կաթում և հեղուկ ՄՌՇ սննդամիջավայրում ամիսը մեկ անգամ փոխացանք կատարելու միջոցով: Միջավայրի pH-ը պահպանվել է 6.5-6.6 սահմաններում, իսկ ջերմաստիճանը՝ $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$, եթե այլ ջերմաստիճան հաջորդիվ նշված չէ: Երկարատև պահպանման համար ԿԹԲ պահվել են սառցախցիկում -32°C ջերմաստիճանում, ՄՌՇ սննդամիջավայրում, որին ավելացվել է գլիցերոլ:

ԿԹԲ աճման տեսակարար արագության որոշումը: Բակտերիաների աճը ուսումնասիրվել է սպեկտրոֆոտոչափիչի միջոցով՝ յուրաքանչյուր կես ժամը մեկ չափելով ԿԹԲ կախույթի օպտիկական խտությունը (Otu_{650}): Աճման տեսակարար արագությունը որոշվել է 0.693-ը ($\ln 2$) բաժանելով Otu կրկնապատկման ժամանակի վրա (աճի լոգարիթմական փուլի, երբ ժամանակի ընթացքում օպտիկական խտության փոփոխությունը գծային բնույթ է կրում) և արտահայտել r^{-1} , կամ d^{-1} չափման միավորներով (Թոչունյան և ուրիշ., 2012):

ԿԹԲ թթվայնության որոշումը ըստ Թյորների (°Թ) աստիճանի: ԿԹԲ թթու առաջացման ընդունակությունը որոշվել է ըստ Թյորների տիտրման մեթոդի (Hakobyan et al., 2016): Տիտրումը իրականացվել է 0,1մոլ/լ⁻¹ NaOH-ի լուծույթով՝ մինչև թույլ վարդագույն երանգավորումը: Արդյունքները արտահայտվել են ըստ Թյորների աստիճանի (°Թ) ծախսված NaOH-ի քանակությունը (մլ-ով) բազմապատկելով 10-ով՝ մլ-ը °Թ-ի վերածելու գործակիցով:

ԿԹԲ ադիեզիայի հատկության ուսումնասիրությունը: Բակտերիական բջիջների ադիեզիայի հատկության ուսումնասիրությունը կատարվել է ապակու

վրա հեմագլյուտինացիայի ռեակցիայի միջոցով՝ մարդու և տարբեր կենդանիների արյան օգտագործմամբ: Հեմագլյուտինացման դրսևորումը էրիթրոցիտներից առնվազն մեկի հետ վկայում է մանրէների ադիեզիայի գործոնների առկայության մասին (Harutyunyan et al., 2015):

ԿԹԲ հակաբակտերիական ակտիվության ուսումնասիրությունը: ԿԹԲ հակաբակտերիական ակտիվությունն ուսումնասիրվել է ազարում դիֆուզիայի մեթոդով (Papagianni et al., 2006): Նախապես պատրաստվել են թեստ-օրգանիզմների գիշերային աճի կուլտուրաներ: Չափվել են թեստ-օրգանիզմների աճի ճնշման գոտիները, և առնվազն 2 մմ եզրագծով աճի ճնշման գոտին ընդունվել է որպես դրական:

ԿԹԲ զգայունության որոշումը հակաբիոտիկների նկատմամբ: Հակաբիոտիկ նյութերի ազդեցությունը ԿԹԲ զարգացման վրա որոշվել է մանրէազերծ կաթին ավելացնելով թորած ջրի մեջ պատրաստված հակաբիոտիկների տարբեր խտությամբ լուծույթներ: Պատրաստի լուծույթը ցանվել է փորձարկվող շտամներով և պահվել կուլտուրայի զարգացման համար օպտիմալ ջերմաստիճանում:

ԿԹԲ զարգացման վրա նիտրատների և պահպանիչների ազդեցության որոշումը: ԿԹԲ դիմացկունությունը նիտրատների և պահպանիչների նկատմամբ որոշվել է կաթում՝ նախապես նրան ավելացնելով վերոհիշյալ նյութերի տարբեր խտություններով լուծույթներ (L.Hakobyan et al., 2016):

ԿԹԲ «ուղիղ» թաղանթային բշտիկների ստացումը: «Ուղիղ» թաղանթային բշտիկները ստացվել են պրոտոպլաստները լիզոցիմով լիզոսի ենթարկելով ըստ Քյոնինգսի և Քեբակի մեթոդի (Konings and Kaback, 1973):

ԱԵՖ-ազային ակտիվության որոշումը: ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը որոշվել է թաղանթային բշտիկների հետ ԱԵՖ-ի ռեակցիայի արդյունքում անջատված անօրգանական ֆոսֆատի ($\text{F}_{\text{անօրգ}}$) քանակի հաշվարկի միջոցով (Tauscky and Shorr 1953): ԱԵՖ-ազային ակտիվությունն արտահայտվել է միավոր ժամանակում սպիտակուցի միավոր քանակից (մկգ) անջատված $\text{F}_{\text{անօրգ}}$ քանակով (մկՄո):

Փորձերի արդյունքների մշակումը: Հետազոտությունների արդյունքները ներկայացված են առնվազն 3 անկախ փորձերի միջին արժեքներով: Փորձերի տվյալները ենթարկվել են վիճակագրական մշակման: Մասնավորապես Սթյուդենտի Թ-թեստի միջոցով փորձերի արդյունքներում ստացված տվյալների հավաստիության գնահատման համար օգտագործվել է R Project for Statistical Computing version R 3.1.0 (Ավստրիա) ծրագիրը: Աշխատանքում բերված արդյունքները հավաստի են ($p < 0.05$), եթե այլ արժեք հաջորդիվ բերված չէ:

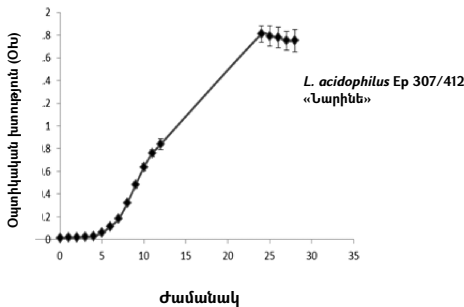
ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐԸ ԵՎ ԴԻԱՆՑ ՔՆՆԱՐԿՈՒՄԸ

***Lactobacillus acidophilus* Ep 317/402 «Նարինե» շտամի աճման տեսակարար արագության և աճի ընթացքում pH-ի փոփոխությունները:**

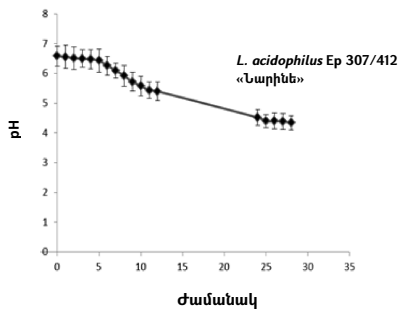
ԿԹԲ աճը ուղղակիորեն բնորոշում է շտամի ներուժային հնարավորությունը պահպանվելու և զարգանալու աղիներում: Աշխատանքի կատարման ընթացքում

որպես առանցքային շտամ վերցվել է *L. acidophilus* Ep 317/402 «Նարինե» շտամը և կատարվել են համեմատական ուսումնասիրություններ այլ պրոբիոտիկ ԿԹԲ շտամների հետ: Ինչպես երևում է Նկ. 1-ից (ա, բ), *L. acidophilus* Ep 317/402 «Նարինե» շտամի ՕԽ աճման կորագիծը և pH արժեքների փոփոխությունները ցուցաբերում են որոշակի օրինաչափություն: Բջջիչների աճման սկզբնական կամ լազ (4-4.5 ժամ) փուլից մինչև էքսպոնենցյալ կամ լոգարիթմական (լոգ) փուլի 11-րդ ժամը ակնհայտորեն նկատվում է ՕԽ և կենսունակ բջջիչների քանակի կտրուկ աճ, pH-ը պահպանվում է 6.5-5.5-ի սահմաններում: Այս փուլը բնութագրվում է բջջիչների բաժանման հաստատուն առավելագույն արագությամբ: Ստացիոնար փուլը բավականին կարճ է (Նկ. 1 ա, բ), և այս փուլում բջջիչների թիվը դադարում է աճել: Բակտերիաների աճմանը զուգընթաց տեղի է ունենում միջավայրի pH-ի անկում, բջջիչների աճման 24-28-րդ ժամում pH-ի ցուցանիշը տատանվում է 4.52-4.34:

ա)



բ)



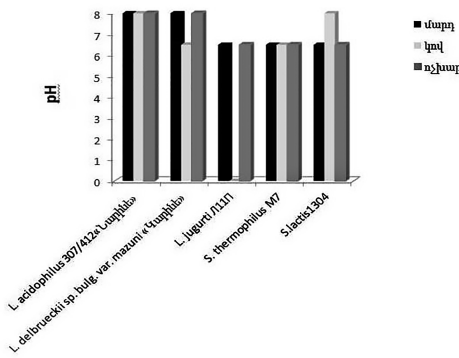
Նկ. 1. *L. acidophilus*-ի աճի ընթացքում ա) ՕԽ-յան և բ) pH-ի փոփոխությունները՝ ժամանակից կախված: Բակտերիաներն աճեցվել են ՄԹՇ սննդային միջավայրում, pH 6.5-ում, կուլտիվացման ջերմաստիճանը $37 \pm 2^\circ\text{C}$:

Նմանատիպ տվյալներ ստացվել են նաև այլ հեղինակների կողմից (Mataragas et al., 2003), երբ *Lactobacillus curvatus* L442 և *Leuconostoc mesenteroides* L124-ի մոտ որպես աճման օպտիմալ pH նույնպես համարվել են 6-6.5 սահմաններում ընկած արժեքները: Ավելի ցածր՝ pH 4-ի պայմաններում բակտերիաների աճը կտրուկ նվազել է: Այս փաստը ևս մեկ անգամ վկայում է այն մասին, որ ցածր pH-ի պայմաններում լակտոբակտերիաների աճման տոկոսը ցածր է: *L. acidophilus* Ep 317/402 «Նարինե» շտամի աճման տեսակարար արագությունը կազմում է 0.63 ± 0.01 ժամ⁻¹:

Պրոբիոտիկ ԿԹԲ ադիեզիայի և հեմոլիտիկ հատկությունները: Ադիեզիան միջավայրի pH 6.5 և pH 8-ում:

Ուսումնասիրված ԿԹԲ շտամների մեծամասնությունը ցուցաբերել են արտահայտված ադիեզիայի հատկություն: Միաժամանակ բոլոր շտամներում նկատվել է հեմոլիտիկ ակտիվության բացակայություն: Ադիեզիայի հատկության հետազոտությունների ընթացքում միջավայրի pH-ը ընտրվել է՝ ելնելով ֆիզիոլոգիական պայմաններում ադիների pH-ից (pH 8) և լակտոբակտերիաների

աճման համար օպտիմալ pH արժեքից (pH 6.5): Հիմնային միջավայրում (pH 8) առավել արտահայտված ադիեզիայի հատկություն նկատվում է *L. acidophilus* Ep 307/412 «Նարինե» և *L. delbrueckii subsp. bulgaricus var. mazuni* «Կարինե» շտամներում, իսկ *S. thermophilus* M7 և *L. jugurti*ուր-ի մոտ ադիեզիայի հատկությունը ամբողջովին ճնշվում է հիմնային pH-ի պայմաններում (Նկ. 2): Ակտիվության անկում նկատվում է նաև *S.lactis* 1304 շտամի մոտ: Կարելի է ենթադրել, որ հիմնային միջավայրը թողնում է որոշակի ազդեցություն կամ բակտերիաների մակերեսային, կամ էրիթրոցիտների մակերեսային ակտիվ մոլեկուլների վրա, ինչի հետևանքով նրանց ադիեզիայի հատկությունը թուլանում է: Այս ցուցանիշը կարևոր է նաև որպես պրոբիոտիկներ նրանց կիրառման համար, քանի որ, ինչպես բազմիցս նշվել է, պրոբիոտիկ շտամերին ներկայացվող հիմնական պահանջներից մեկը հանդիսանում է ադեստամոքսային ուղիով անցման ընթացքում աղիների հիմնային pH-ում իրենց ակտիվության պահպանումը (Ljungth and Wadström, 2006):



Նկ. 2. ԿԹԲ ադիեզիայի հատկությունը կախված միջավայրի pH-ից: Բակտերիաները աճեցվել են pH 6.5 և 8-ում, 37°C ջերմաստիճանում:

ԿԹԲ հակաբակտերիական ակտիվության ուսումնասիրումը: Պայմանական ախտածին էնտերոբակտերիաների և պրոբիոտիկ ԿԹԲ ադիեզիվության համեմատական գնահատումը:

Վարակի առաջնային օջախում մանրէների բազմացմանը և թունավոր հատկությունների դրսևորմանը նախորդում է նրանց ադիեզիան՝ ամրացումը հյուսվածքին, լորձաթաղանթին, որտեղից էլ սկսվում է վարակիչ գործընթացի հավանական զարգացումը: Ինչպես երևում է Աղ. 1-ից, ԿԹԲ շտամներից արտահայտված հակաբակտերիական ակտիվություն ցուցաբերում է *L. acidophilus* Ep 317/402 «Նարինե» շտամը՝ ճնշելով ինչպես գրամ-դրական, այնպես էլ գրամ-բացասական ախտածին միկրոօրգանիզմների աճն ու զարգացումը: Այս շտամում առավել լայն աճի ճնշման գոտի նկատվում է *Bacillus subtilis* և *Pseudomonas aeruginosa*-ի նկատմամբ (27 մմ): Փորձարկված շտամներից գրեթե բոլորը ցուցաբերում են համեմատաբար թույլ արտահայտված հակաբակտերիական ազդեցություն *Klebsiella pneumoniae*-ի նկատմամբ՝ առաջացնելով միջինում 17±0.25մմ տրամաչափով աճի ճնշման գոտի (Աղ. 1): Նմանատիպ արդյունքներ գրանցվել են նաև Կալալուի և ուրիշն. (Kalalou et al., 2004) աշխատանքներում, որտեղ նշվում են մի շարք ԿԹԲ, որոնք ցուցաբերել են անտագոնիստական

հատկություններ հետևյալ ախտածին միկրոօրգանզմների նկատմամբ՝ *E.coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumonia*, *S. aureus*, *B. cereus*, և աճի ճնշման գոտիները տատանվել են 14-28 մմ-ի սահմաններում:

Աղ. 1. ԿԹԲ հակաբակտերիական ակտիվությունը որոշ ախտածին միկրոօրգանզմների նկատմամբ:

Թեստ-միկրոօրգանիզմներ	<i>Lactobacillus</i>		
	<i>acidophilus</i> Ep 317/402 «Նարինե»	<i>jugurti</i> մոմ	<i>delbrueckii subs.bulgaricus var. mazoni</i> «Կարինե»
	աճի ճնշման գոտիներ, մմ		
<i>S. aureus</i>	25±1.5	23±1.4	19±1.0
<i>B. subtilis</i>	27±1.4	22±1.1	23±1.2
<i>M.phlei</i>	24±1.2	18±1.0	19±0.9
<i>S. paratyphi</i>	26±1.3	19±1.0	26±1.3
<i>S. typhi</i>	25±1.0	18±0.8	24±1.2
<i>Citrobacter sp.</i>	26±1.6	17±1.0	20±1.2
<i>K. pneumoniae</i>	23±1.2	17±0.9	17±0.8
<i>P.aeruginosa</i>	27±1.6	21±1.1	25±1.3
<i>E.coli</i>	26±1.3	20±1.2	20±1.2

Հայտնի են գաղութացնող գործոնների հակազեններ, որոնք լինում են երկու տիպի՝ CFA I և CFA II (Հարությունյան և ուրիշ., 2015): Այս գործոնները հնարավորություն են տալիս մանրէներին ադիեզվելու մարդու աղիների էպիթելային բջիջների համապատասխան ռեցեպտորներին:

Ինչպես երևում է Աղ. 2-ից, պայմանական ախտածին էնտերոբակտերիաների մոտ գաղութացնող գործոնները հայտնաբերվել են 52 դեպքերում (52.0±5.0%),

Աղ. 2. Պայմանական ախտածին էնտերոբակտերիաների և կաթնաթթվային պրոբիոտիկ բակտերիաների ադիեզիվության ստուգման արդյունքները:

Մանրէի տեսակ	CFA		CFA I		CFA II	
	բաց.թ.	%	բաց.թ.	%	բաց.թ.	%
<i>Citrobacter</i> (20 շտամ)	10	50.0±11.1	4	40.0±15.5	6	60.0±17.3
<i>K. pneumoniae</i> (20 շտամ)	12	60.0±10.9	5	41.7±14.2	7	58.3±14.2
<i>Serratia</i> (20 շտամ)	8	40±10.9	4	50.0±17.7	4	50.0±17.7
<i>P. vulgaris</i> (20 շտամ)	11	55.0±11.1	5	45.5±15.0	6	54.5±15.0
<i>P. mirabilis</i> (20 շտամ)	11	55.0±11.1	5	45.5±15.0	6	54.5±15.0
Ընդհանրը Պայմանական ախտածին էնտերոբակտերիաներ (100 շտամ)	52	52.0±5.0	23	44.2±6.9	29	55.8±6.9
Կաթնաթթվային բակտերիաներ (20 շտամ)	7	3.5±10.7	5	71.4±17.0	2	28.6±17.0

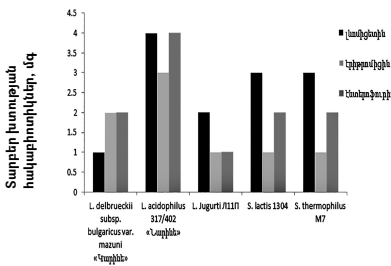
որոնք առավելապես արտահայտված են *K. pneumonia* (60.0±10.9%), *P. vulgaris* և *P. mirabilis* շտամների մոտ (55.0±11.1%) (Աղ. 2): Ընդհանուր առմամբ CFA I գործոնը հայտնաբերվել է 23 (44.2±6.9%), իսկ CFA II գործոնը՝ 29 դեպքերում

(55.8±6.9%): ԿԹԲ մոտ ադիեզիվության CFA գործոնը հայտնաբերվել է յոթ դեպքերում (35.0±10.7%), որոնցից CFA I՝ հինգում (71.4±17.0%), իսկ CFA II՝ երկուսում (28.6±17.0%): Ստացված արդյունքները վկայում են այն մասին, որ ախտածնության հատկություններն առավել վառ արտահայտված են այն պայմանական ախտածին էնտերոբակտերիաներում, որոնց մոտ գերակշռում է ախտածնության CFA II գործոնը: Իսկ պրոբիոտիկ ԿԹԲ մոտ գերակշռում է CFA I գործոնը: Վերլուծելով Աղ. 1 և 2՝ կարելի է ենթադրել, որ ԿԹԲ մեծամասնության համեմատաբար թույլ արտահայտված հակաբակտերիական ազդեցությունը *K. pneumoniae*-ի նկատմամբ պայմանավորված է վերջինիս մոտ գաղութացնող գործոնի բարձր տոկոսով: Պարզվել է նաև, որ *L. acidophilus* Ep 317/402 «Նարինե», *L. delbrueckii subs. bulgaricus var. mazuni* «Կարինե» ունեն CFA I տիպի ադիեզիներ, *S. lactis* 1304՝ CFA II, իսկ *L. jugurti*, *S. thermophilus* M7 շտամները ունեն P տիպի ֆիմբրիաներ (Հարությունյան և ուրիշ., 2015):

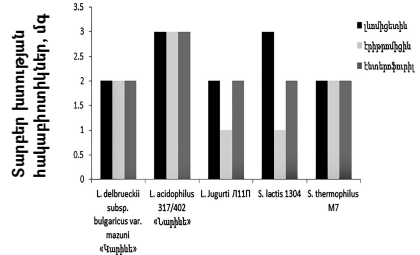
Հակաբիոտիկների ազդեցությունը ԿԹԲ ադիեզիայի հատկության վրա:

Մարդու արյան էրիթրոցիտների հեմագլյուտինացման ռեակցիայի արդյունքում (Նկ. 3ա) առանձացվել է *L. acidophilus* Ep 317/402 «Նարինե» շտամը, որը ցուցաբերում է ադիեզիայի հատկություն լումիցետինի և էնտերոֆորիլի ≤0.004% խտությունների կիրառման պայմաններում:

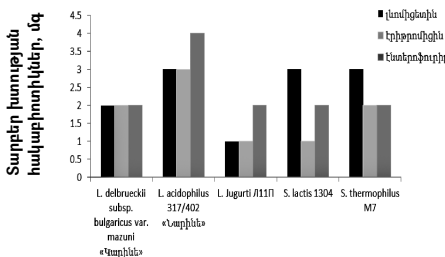
ա) մարդու արյուն



բ) կովի



գ) ոչխարի



Նկ. 3 ա, բ, գ. ԿԹԲ ադիեզիայի հատկությունը տարբեր խտության լումիցետինի, էրիթրոմիցինի, էնտերոֆորիլի ազդեցությամբ: Ուսումնասիրության համար օգտագործվել են երեք տեսակի արյուն՝ ա) մարդու, բ) խոշոր եղջերավոր կենդանու (կով), գ) մանր եղջերավոր կենդանու (ոչխար), որոնցից պատրաստվել են էրիթրոցիտների երեք տոկոսանոց կախյալներ:

Թույլ արտահայտված ադիեզիայի հատկություն նկատվում է *L. Jugurti* շտամում: Ի տարբերություն մարդու էրիթրոցիտների՝ կովերի արյան կարմիր բջիջներին ԿԹԲ ադիեզիան նույնպես արտահայտված է *L. acidophilus* Ep 317/402

«Նարինե» շտամում նշված բոլոր հակաբիոտիկների կիրառման ժամանակ (Նկ. 3բ): Իսկ ոչխարի արյան էրիթրոցիտների հետ հեմագլյուտինացիայի ռեակցիայի ընթացքում *L. acidophilus* Ep 317/402 «Նարինե» շտամը ցուցաբերել է արտահայտված ադիեզիա միայն էստերոֆորիլի 0.004%-ի դեպքում (Նկ. 3գ): Ուշադրության է արժանի այն փաստը, որ *S. lactis* 1304 և *S. thermophilus* M7 շտամները, որոնք ըստ իրենց հատկությունների համարվում էին համեմատաբար թույլ շտամներ, այնուամենայնիվ պահպանում են իրենց ադիեզիայի հատկությունը: Այսպիսով, *L. acidophilus* Ep 317/402 «Նարինե» շտամը մարդու և կենդանիների արյան կարմիր բջիջների հեմագլյուտինացիայի ռեակցիայի ժամանակ տարբեր խտության հակաբիոտիկների կիրառման պայմաններում ցուցաբերում է արտահայտված ադիեզիայի հատկություն, ինչը աղետամոքսային ուղիով անցման ժամանակ նրա կենսունակության պահպանման համար հանդիսանում է կարևոր նախապայման: Ստացվում է, որ ադիեզիայի հատկության թուլացումը ուղիղ համեմատական է հակաբիոտիկների քանակությանը կաթում: Բացի այդ, հակաբիոտիկների խտությունների աստիճանական բարձրացմանը զուգընթաց ԿԹԲ աճման արգելակումը թույլ է տալիս ենթադրել, որ տվյալ շտամը հավանաբար չի կրում հակաբիոտիկ-կայուն գեներ, որոնք կփոխանցվեն ախտածին միկրոօրգանիզմներին: Հետևաբար այն լիարժեք կարող է գտնել իր կիրառությունը որպես պրոբիոտիկ բժշկության մեջ, դեղագործության ոլորտում և կաթնամթերքների արտադրության ժամանակ:

Նիտրատների ազդեցությունը պրոբիոտիկ ԿԹԲ կենսունակության և ադիեզիայի հատկության դրսևորման վրա:

Ուսումնասիրելով նիտրատների (NaNO_3 , KNO_3) ազդեցությունը ԿԹԲ՝ լակտոբացիլների և ստրեպտոկոկային շտամների աճման վրա՝ պարզվել է, որ շտամների մեծամասնության աճը ճնշվում է NO_3^- -ի բարձր խտությունների պայմաններում ($\leq 2\%$) (Աղ. 3): Այն ժամանակ, երբ NaNO_3 և KNO_3 խտությունները եղել են 2-2.5%, շտամների մեծ մասը դադարել են աճել և արդյունքում ադիեզիայի հատկություն չեն ցուցաբերել (Նկ. 4): Սակայն *L. acidophilus* Ep 317/402 «Նարինե» շտամը պահպանել է կենսունակությունը նման պայմաններում, մինչդեռ ստրեպտոկոկային շտամներ *S. lactis* 1304 և *S. thermophilus* M7-ը չեն աճել միջավայրում, որտեղ NO_3^- -ի խտությունը եղել է $\leq 1\%$ (Աղ. 3):

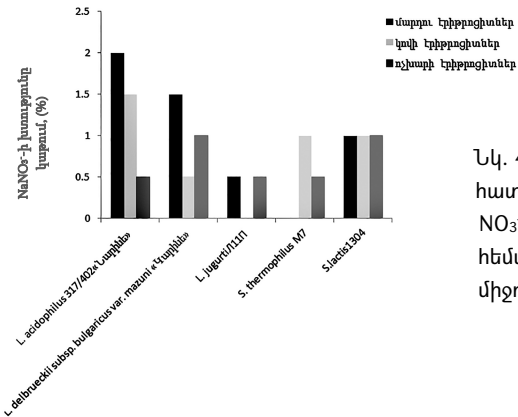
Աղ. 3 Լակտոբացիլների և ստրեպտոկոկերի աճը տարբեր խտության NO_3^- -ի պայմաններում

ԿԹԲ տեսակներ, շտամներ	NO_3^- -ի խտությունները (%)							
	NaNO_3				KNO_3			
	0.5	1.0	1.5	2.0	0.5	1.0	1.5	2.0
<i>L.acidophilus</i> 317/402 «Նարինե»	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> var. <i>mazuni</i> «Կարինե»	+	+	+	-	+	+	-	-
<i>L. Jurgurtini</i>	+	-	-	-	+	+	+	-
<i>S. thermophilus</i> M7	+	+	-	-	+	+	-	-
<i>S. lactis</i> 1304	+	+	-	-	+	-	-	-

*(-) նշանակում է աճ չկա

Չնայած նիտրատների բարձր խտություններին՝ ԿԹԲ երբեմն մակարդում են կաթը, բայց այդ մակարդները վերացանք կատարելուց հետո կաթը այլևս չեն մակարդում: *L. acidophilus* Ep 317/402 «Նարինե» և *L. delbrueckii subs. bulgaricus var. mazuni* «Կարինե» շտամները նիտրատ պարունակող կաթում աճելիս ցուցաբերել են արտահայտված հեմագլյուտինացիա մարդու էրիթրոցիտների հետ՝ համեմատած կովի և ոչխարի (Նկ. 4): Միայն *S. thermophilus* M7-ում չի նկատվել որևիցե ռեակցիա մարդու էրիթրոցիտների հետ փոխազդեցության ժամանակ: Պրոբիոտիկ ԿԹԲ ադիեզիայի հատկության նվազումը ուղիղ համեմատական է NO_3^- -ի խտության բարձրացմանը: 2% (մոտ 4 անգամ ավելի) խտության հասնելիս ընկնում է ադիեզիայի ունակությունը ($p < 0.05$) (Նկ. 4): Իսկ NO_3^- -ի 2% խտության պայմաններում կովի և ոչխարի էրիթրոցիտների հետ ընդհանրապես բացակայում է ադիեզիան ($p < 0.01$):

Որոշվել է նաև թթվազոյացման ակտիվությունը ԿԹԲ աճման 7-րդ օրում տարբեր խտության (0.5-2.0%) NO_3^- -ի առկայության պայմաններում: *L. acidophilus* Ep 317/402 «Նարինե» շտամի մոտ ստուգիչ կաթում 340°C թթվությունը NaNO_3 և KNO_3 -ի դեպքում իջել է համապատասխանաբար մինչև 80°C ՝ 2% և 62°C ՝ 1.5% խտությունների պայմաններում:



Նկ. 4 ԿԹԲ շտամների ադիեզիայի հատկությունը տարբեր խտության NO_3^- -ի կիրառման պայմաններում հեմագլյուտինացիայի ռեակցիայի միջոցով՝ մարդու, կովի և ոչխարի արյան կարմիր բջիջների օգտագործմամբ:

Ուսումնասիրված լակտոբացիլների և ստրեպտոկոկային շտամների մոտ նվազագույն թթվությունը գրանցվել է այս շտամում: Ի տարբերություն լակտոբացիլների՝ ստրեպտոկոկերում նկատվել է ավելի ցածր թթվություն: *S. thermophilus* M7-ում NaNO_3 և KNO_3 -ի 1% խտության դեպքում՝ 64 ու 66°C համապատասխանաբար, իսկ *S. lactis* 1304-ի մոտ NaNO_3 -ի 1% դեպքում՝ 54°C թթվություն: Ստացված տվյալները ցույց են տալիս, որ նիտրատների բարձր խտությունները ($\leq 2\%$) ճնշում են երկու տեսակի ԿԹԲ՝ լակտոբացիլների և ստրեպտոկոկերի աճը, սակայն համեմատած ստրեպտոկոկերի՝ լակտոբացիլները ցուցաբերում են ավելի բարձր դիմացկունություն և ադիեզիայի հատկություն:

Նիտրատների ազդեցությունը *L. acidophilus* Ep 317/402 «Նարինե»-ի թաղանթային բշտիկներում ԱԵՖ-ազային ակտիվության վրա:

Շտազոտության արդյունքում պարզվել է, որ *L. acidophilus*-ի թաղանթային բշտիկների ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը ճնշվում է տարբեր խտության (1, 1.5 և

2.0%) NaNO_3 -ի պայմաններում համեմատած ստուգիչի հետ (առանց NO_3^- և F_2SO_4), և այդ արգելակումը առավել արտահայտիչ է F_2SO_4 (0.1մՄ) առկայությամբ (Աղ. 4): NO_3^- -ի խտության աստիճանական բարձրացումը, առավել ևս զուգակցումը F_2SO_4 -ի հետ, ուղեկցվում է ԱԵՖ-ազային ակտիվության ճնշմամբ: Կարելի է ենթադրել, որ այդ ժամանակ F_2SO_4 -ի կառուցվածքում առաջանում են տարածական փոփոխություններ՝ ճնշելով ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը: Սակայն հետաքրքրությունը կայանում է նրանում, որ NaNO_3 -ի համեմատաբար ցածր խտությունների (1-1.5%) ժամանակ, pH 6.5-ում ԱԵՖ-ազային ակտիվությունն առավել ուժեղ է ճնշվում՝ համեմատած բարձր խտությանը (2%):

Աղ. 4. NO_3^- -ի տարբեր խտությունների, ինչպես նաև F_2SO_4 ազդեցությունը *L. acidophilus* Ep 317/402 «Նարինե» ացիդոֆիլային բակտերիայի թաղանթային բշտիկներում ԱԵՖ-ազային ակտիվություն վրա:

Աճման պարամետրեր	Օպտիկական խտություն (OD)	ԴՅԿԴ-զգայուն ԱԵՖ-ազային ակտիվություն* (մկՄ Ֆանոթգ/ր/մկգ սպիտակուց)
Control - NaNO_3 - F_2SO_4	0.0087±0.0004	182.2±9.2
NaNO_3 1%	0.0044±0.0003	92.17±5.4
NaNO_3 1% + F_2SO_4	0.00085±0.0003	17.85±1.1
NaNO_3 1.5%	0.003±0.0001	63±3.8
NaNO_3 1.5% + F_2SO_4	0.0015±0.0001	15.6±0.8
NaNO_3 2%	0.0035±0.0002	73.32±4.0
NaNO_3 2% + F_2SO_4	0.0009±0.00005	20±1.2
- NaNO_3 + F_2SO_4	0.00086±0.00005	18.85±1.1

*ԴՅԿԴ-զգայուն ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը որոշվել է F_2SO_4 -ով և առանց F_2SO_4 -ի նմուշների տարբերությամբ

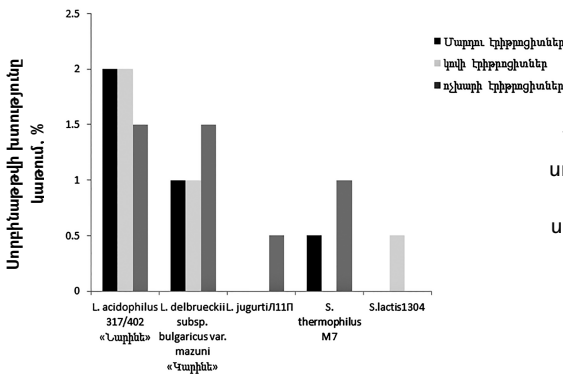
Նմանատիպ տվյալներ ստացվել են նաև KNO_3 -ի դեպքում (Harutyunyan et al., 2015): Հավանաբար դա պայմանավորված է պաշտպանական մեխանիզմներով, որոնք ակտիվանում են բարձր խտության NO_3^- -ի պայմաններում: Ստացված տվյալներից կարելի է ենթադրել, որ F_2SO_4 -ԱԵՖ ազդը կարող է հանդիսանալ թիրախ նիտրատ իոնների համար (KNO_3 , NaNO_3), նույնիսկ նրանց ցածր խտության պայմաններում:

Պահպանիչների ազդեցությունը ԿԹԲ զարգացման և ադիեզիայի վրա:

Ի տարբերություն նիտրատների ազդեցությանը ԿԹԲ ադիեզիայի հաստկության վրա, սորբինաթթուն թողնում է առավել արտահայտված ընկճող ազդեցություն: Իրականացված հետազոտության արդյունքները ևս մեկ անգամ հաստատում են գրականության մեջ ավելի վաղ ի հայտ եկած տվյալները այն մասին, որ սորբինաթթվի $\leq 0.3\%$ օգտագործումը սննդի մեջ թողնում է բակտերիոստատիկ ազդեցություն, իսկ ավելի բարձր խտությունները՝ բակտերիոցիդ (Davidson et al., 2005): Կաթնաթթվային ստրեպտոկոկների աճը ամբողջովին ճնշվում է

սորբինաթթվի 0.7-1.0%, իսկ ձողաձև ԿԹԲ՝ 1.5-2.0% խտությունների ժամանակ (Նկ.5):

Հաստատվել է, որ սորբինաթթվի 1.5-2.0% առկայության պայմաններում բարձր դիմացկունություն են ցուցաբերում *Lactobacillus* ցեղի ներկայացուցիչները: Պետք է նշել, որ բարձր խտությամբ սորբինաթթվի կիրառման ժամանակ ադիեզիա գրանցվում է մեծամասամբ ոչխարի էրիթրոցիտների հեմագլոտինացիայի ռեակցիայի արդյունքում: Կարելի է ենթադրել, որ որքան յուրահատուկ է ադիեզիան շտամային տեսակից կախված, այնքան էլ՝ արյունից: *L. jugurti* և *L. delbrueckii* մարդու և կովի արյան կարմիր բջիջների հետ հեմագլոտինացիայի ժամանակ ընդհանրապես չի ցուցաբերում ադիեզիա և միայն ոչխարի դեպքում դրսևորում է ադիեզիայի հատկություն՝ 0.5% սորբինաթթվի խտության առկայության պայմաններում: (Նկ. 3.6):



Նկ.5. 0.5-2.0% խտությամբ սորբինաթթվի ազդեցությունը լակտոբակտերիաների և ստրեպտոկոկների ադիեզիայի հատկության վրա:

Ստրեպտոկոկային շտամներից՝ *S. thermophilus* M7-ի վրա սորբինաթթվի ընկճող ազդեցությունը ավելի թույլ է արտահայտված՝ համեմատած *S.lactis* 1304-ի հետ: Լակտոբացիլներից՝ *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* var. *mazuni* «Կարինե» շտամը ցուցաբերում է դիմացկունություն և բարձր ադիեզիայի հատկություն սորբինաթթվի 1-1.5% խտությունների ժամանակ, իսկ առավելագույն՝ 2%-ի ժամանակ ադիեզիա ցուցաբերում է *L. acidophilus* Ep 317/402 «Նարինե» շտամը:

ԵԶՐԱԿԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

1. ԿԹԲ՝ լակտոբացիլների և ստրեպտոկոկային շտամների մեծամասնության մոտ ադիեզիայի հատկությունը ճնշվում է միջավայրի pH 8-ի պայմաններում, իսկ pH 6.5-ը սահմանվել է ադիեզիայի համար նպաստավոր պայման:
2. Ուսումնասիրված շտամներից արտահայտված հակաբակտերիական ակտիվություն ցուցաբերում է *L. acidophilus* Ep 317/402 «Նարինե» շտամը՝ ճնշելով ինչպես գրամ-դրական, այնպես էլ գրամ-բացասական ախտածին միկրոօրգանիզմների աճը և զարգացումը:
3. Պայմանական ախտածին էնտերոբակտերիաներում գերակշռում է ադիեզիվության CFA II գործոնը, իսկ պրոբիոտիկ ԿԹԲ-ում՝ CFA I գործոնը: Հաստատվել է նաև, որ *L. acidophilus* Ep 317/402 «Նարինե», *L. delbrueckii*

subs. bulgaricus var. mazuni «Կարինե» շտամները ունեն CFA I տիպի ադիեզիներ, *S. lactis* 1304-ը՝ CFA II, իսկ *L. jugurti*, *S. thermophilus* M7 շտամները ունեն P տիպի ֆիմբրիաներ:

4. *L. acidophilus* Ep 317/402 «Նարինե» շտամը ցուցաբերում է բարձր դիմացկունություն և արտահայտված ադիեզիայի հատկություն լումիցետինի և էստերոֆորիլի $\leq 0.004\%$, իսկ էրիթրոմիցինի՝ $\leq 0.003\%$ խտությունների դեպքում: Առավել բարձր խտությունների դեպքում նկատվում է հակաբիոտիկ նկատմամբ զգայունության մեծացում:
5. Բարձր խտության նիտրատների ($\leq 2\%$) առկայության պայմաններում ճնշվում է և՛ լակտոբացիլների, և՛ ստրեպտոկոկների աճը, սակայն, համեմատած ստրեպտոկոկային շտամների, լակտոբացիլները ցուցաբերում են բարձր դիմացկունություն և ադիեզիայի հատկություն մարդու, կովի և ոչխարի էրիթրոցիտների հեմագլյուտինացման ռեակցիայի արդյունքում: Այդ պայմաններում նվազում է *L. acidophilus* Ep 317/402 «Նարինե» շտամի թաղանթային բշտիկներում պրոտոնային FoF₁-ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը:
6. Կաթնաթթվային ստրեպտոկոկների փորձարկված շտամները ամբողջովին ճնշվում են սորբինաթթվի 0.7-1% խտությունների կիրառման ժամանակ՝ ցուցաբերելով թույլ արտահայտված ադիեզիայի հատկություն, իսկ լակտոբացիլները՝ 1.5-2.0%-ի:
7. ԿԹԲ, հատկապես *L. acidophilus* Ep 317/402 «Նարինե» շտամի ադիեզիայի հատկությունը կարող է պայմանավորված լինել տարբեր գործոններով, նպաստել նրանց հակաբակտերիական ակտիվությանը և նիտրատների նկատմամբ կայունությանը՝ կարգավորելով ադեստամոքսային միկրոբիոտան:

ԱՏԵՆԱՆՈՍԻԹՅԱՆ ԹԵՄԱՅՈՎ ՀՐԱՏԱՐԱԿՎԱԾ ԱՇԽԱՏԱՆՔՆԵՐԻ ՑԱՆԿ

1. Հարությունյան Կ.Վ. Կոնսերվանտների ազդեցությունը կաթնաթթվային բակտերիաների զարգացման վրա // Առողջապահություն, 2010, N 4, էջ 8-10:
2. Հակոբյան Լ.Հ., Մելիք-Անդրեասյան Գ.Գ., Հարությունյան Ն.Մ., Հարությունյան Կ.Վ., Թոչունյան Ա.Հ., Հարությունյան Մ.Վ. Կենսաբանական բարձր հատկություններով օժտված պրոբիոտիկ կաթնաթթվային բակտերիաների ստացումը // Համաճարակաբանության արդիական հարցեր, միջազգային կոնֆերանսի նյութեր, Երևան, 2013թ., էջ 22-26:
3. Հարությունյան Ն.Մ., Լալայան Ա.Ա., Ալեքսանյան Յու. Թ., Մելիք-Անդրեասյան Գ.Գ., Հարությունյան Կ.Վ., Թոչունյան Ա.Ա. Պայմանական ախտածին էստերոբակտերիաների և պրոբիոտիկ կաթնաթթվային բակտերիաների ադիեզիվության համեմատական գնահատականը // Հայաստանի բժշկագիտություն, Երևան, 2015, LV, №2, էջ 48-52:
4. Հակոբյան Լ. Հ., Հարությունյան Ն. Մ., Հարությունյան Կ. Վ., ՀՀ ԳԱԱ թղթակից անդամ Ա. Հ. Թոչունյան Ավանդական հայկական կաթնամթերքներ՝ մածուցի, յուղորդի մանրէաբանական և ադիեզիվ հատկությունները // ՀՀ ԳԱԱ, Ձեկույցներ, Երևան, 2016, Հ 116, № 2, էջ 154-167:
5. Акопян Л.Г, Арутюнян М.В, Арутюнян К.В. Влияние нитратов на развитие молочнокислых бактерий // Актуальные вопросы эпидемиологии

- инфекционных болезней, материалы научно-практической конференции с международным участием, Ереван, 2009, с. 7-10.
6. Арутюнян М.В., Арутюнян К.В., Акопян Л.Г. Пробиотик “Нарине” как биодобавка для коррекции и лечения некоторых заболеваний // Второй международный симпозиум “Биофарма-2010 от науки к промышленности”, сборник тезисов, Ереван 17-20 мая 2010 г., с. 4-5.
 7. Акопян Л.Г., Арутюнян М.В., Арутюнян К.В. Применение пробиотических молочнокислых бактерий для коррекции биоценоза желудочно-кишечного тракта // Известия Национального Аграрного Университета Армении, 1(41)2013, с. 101-105.
 8. Арутюнян Н.М., Алексанян Ю.Т., Мелик-Андреасян Г.Г., Акопян Л.Г., Арутюнян К.В., Арутюнян М.В., Трчунян А.А. Способность адгезии и приживаемости пробиотика *L. acidophilus* Er 317/402 “Наринэ” в пищеварительном тракте и слизистой оболочке толстого кишечника // Актуальные вопросы эпидемиологии, материалы научно-практической конференции с международным участием, Ереван, 2013, с 58-60.
 9. Акопян Л. Г., Казарян П.А., Александрян М. А., Арутюнян К. В., Трчунян А. А.. Пробиотический штамм *Lactobacillus acidophilus* Er 317/402 «Наринэ» с высокими адгезивными и антибиотическими свойствами и его применение при остром лейкозе у детей // Технологии живых систем, 2016, т. 13, №3, ст. 30-37.
 10. Hakobyan L., Harutyunyan K., Harutyunyan N., Melik-Andreasyan G., Trchounian A. Adhesive Properties and Acid-Forming Activity of *Lactobacilli* and *Streptococci* Under Inhibitory Substances, Such as Nitrates // Current Microbiology 2016, V. 72, № 6, pp. 776-782.
 11. Harutyunyan K.V. The influence of antibiotics on adhesive properties and survival of probiotic lactic acid bacteria // Scientific Medical Journal, 2015; 10:2, pp. 24-29.
 12. Harutyunyan K.V., Soghomonian D.R., Hakobyan L.G., Trchounian A. Adhesive properties and the FoF₁ ATPase activity of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* 317/402 “Narine” // 3-rd International Scientific Conference of Young Researchers. Dialogues on Science. Book of abstracts, 2015 June 23-26, Yerevan, Armenia, p. 72.
 13. Soghomonian D., Harutyunyan K., Trchounian A. The effects of antibiotics and different hostile conditions on survival and adhesion of probiotic lactic acid bacteria in vitro in model of human gastrointestinal tract // 6th Congress of European Microbiologists, 2015, 7-11 June, Maastricht, The Netherlands, FEMS- 1066.
 14. Harutyunyan K.V., Hakobyan L., Trchounian A. Adhesive and antimicrobial properties of *Lactobacillus acidophilus* strain Er 317/402 "Narine" for its use in some types of blood cancer // FEBS Journal 281, Suppl. 1, 2014, Paris, pp. 728-729.
 15. Harutyunyan K.V., Hakobyan L.H., Trchounian A.A. The Adhesive Properties and Hemolytic Activity of Probiotic Lactic Acid Bacteria // 2-nd International Scientific Conference of Young Researchers “Contribution of the Young Generation in the Development of Biotechnology”, Book of Articles and Abstracts, October 1-4, 2013, Yerevan, Armenia, p. 73.

АРУТЮНЯН КАРИНЕ ВИКТОРОВНА

Адгезия пробиотических молочнокислых бактерий как регулирующий фактор нормальной микробиоты желудочно-кишечного тракта

РЕЗЮМЕ

Ключевые слова: *Lactobacillus acidophilus*, молочнокислые бактерии, лактобациллы, стрептококки, адгезия, антибактериальная активность, антибиотики, нитраты, консерванты, АТФазная активность.

Свойства молочнокислых бактерий (МКБ) к адгезии на слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта способствуют жизнеспособности штамма в кишечнике и помогают конкурентным способом вытеснять потенциально-патогенные микроорганизмы (Kolida et al., 2011). Адгезивные свойства пробиотических бактерий были изучены на различных эпителиальных клетках, таких как Caco-2 или клетки Hela (Dmitrov, 2014; Ranadheera et al., 2014). Однако в литературе очень мало данных по исследованиям, сделанных по адгезии на эритроцитах, но именно этот факт позволяет говорить о новизне и сложности проделанной работы. У штамма *L. acidophilus* Ep 317/402 “Наринэ” впервые были изучены адгезивные свойства путем реакции гемагглютинации. Применяя эритроциты как объект исследования учитывался тот факт, что гликофорин, который располагается на их поверхности, идентичен гликокаликсу эпителиальных клеток, на которых присутствуют рецепторы бактериальной адгезии (Билалов и др., 2006). В ходе исследования при помощи скрининга был выделен штамм *L. acidophilus* Ep 317/402 “Наринэ”, обладающий наиболее сильными свойствами. Выявлено, что большинство изученных штаммов - *L. acidophilus* Ep 317/402 “Наринэ”, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus var. mazuni* “Карине”, *L. jugurti*_{тип}, *S. lactis* 1304, *S. thermophilus* M7 – вызывают реакцию гемагглютинации эритроцитов, выявляя при этом высокие адгезивные свойства. Ни один из изученных штаммов не проявлял гемолитической активности. Для того, чтобы понять, действительно ли адгезивность обусловлена специфическими факторами колонизации (CFA), были исследованы адгезины МКБ. В результате исследования было выявлено, что штаммы *L. acidophilus* Ep 317/402 “Наринэ”, *L. delbrueckii subs.bulgaricus var. mazuni* “Карине” имеют адгезины типа CFA I, штамм *S. lactis* 1304 имеет CFA II, а *L. jugurti*, *S. thermophilus* M7, имеют фимбрии типа P. Следовательно, разные штаммы, принадлежащие к одному и тому же роду, обладают разными типами адгезинов и, естественно, адгезивность становится строго штаммоспецифическим. Из изученных штаммов у штамма *L. acidophilus* Ep 317/402 “Наринэ” была замечена широкая зона подавления по

отношению *B. subtilis* и *P. aeruginosa* и сравнительно низкая антагонистическая активность по отношению к *K. Pneumonia*, выявляя в среднем рост зоны подавления диаметром 17-23 мм. Позднее выяснилось, что сравнительно слабо выраженное антибиотическое воздействие большинства МКБ по отношению к *K. pneumonia*, обусловлено именно высокой степенью фактора колонизации адгезивности последних. В ходе исследования устойчивости МКБ по отношению к антибиотикам и влияния этих средств на адгезивную способность, был изолирован штамм *L. acidophilus* Ер 317/402 “Наринэ”, при разных концентрациях всех трех антибиотиков он показал высокие адгезивные свойства, что является важным предусловием для сохранения жизнеспособности бактерий при прохождении через желудочно-кишечный тракт. Кроме того, торможение роста МКБ по мере увеличения концентрации антибиотиков, позволяет предположить, что данный вид штамма не несет устойчивые к антибиотикам гены, которые передались бы патогенным микроорганизмам. Следовательно, штамм может всецело найти свое применение в качестве пробиотика в медицине, фармацевтике и производстве молочных продуктов (Meng et al., 2014). Высокая плотность ($\leq 2\%$) NO_3^- подавляет большинство бактериальных штаммов. Однако штамм *L. acidophilus* Ер 317/402 “Наринэ” сохраняется в подобных условиях. Было показано, что нитраты подавляют АТФазную реакцию в мембранных везикулах штамма *L. acidophilus*. Надо отметить, что NO_3^- влияет также на ДЦКД-чувствительную часть АТФазной реакции, что свидетельствует о том, что мишенью действия этих веществ является H^+ ионы транспортирующие F_0F_1 -АТФазный комплекс, так как ДЦКД является характерным ингибитором для последнего. Из полученных данных можно предположить, что F_0F_1 -АТФаза может стать мишенью для нитрат-ионов даже при низких концентрациях. Выяснилось, что штамм *L. delbrueckii subsp. bulgaricus var. mazuni* “Карине” проявлял выносливость и высокие адгезивные свойства при высокой плотности сорбиновой кислоты, а при наивысшей плотности (2%) проявил адгезию штамм *L. acidophilus* Ер 317/402 “Наринэ”, что делает возможным его применение в биотехнологии, медицине, ветеринарии и пищевой промышленности. Полученные результаты свидетельствуют, что штамм *L. acidophilus* Ер 317/402 “Наринэ”, наделенный высокими адгезивными свойствами имеет важное прикладное значение и может использоваться как в профилактических, так и лечебных целях.

Adhesion of probiotic lactic acid bacteria as a regulatory factor in the normal gastrointestinal microbiota

SUMMARY

Key words: *Lactobacillus acidophilus*, lactic acid bacteria, lactobacilli, streptococci, adhesion, antibacterial activity, antibiotics, nitrates, preservatives, ATPase activity.

The properties of the lactic acid bacteria (LAB) to adhere to the mucosa of the gastrointestinal tract promote viability of the strain in the intestine and helps to suppress of potentially pathogenic microorganisms by competitive manner (Kolida et al., 2011). Adhesive properties of probiotic bacteria have been studied on various epithelial cells such as Caco-2 or Hela cells (Dmitrov, 2014; Ranadheera et al., 2014). However, in literature it is very few data on the study of adhesion on red blood cells, but this fact suggests the novelty and complexity of the work. In strain of *L. acidophilus* Er 317/402 "Narine" was first investigated adhesive properties by reaction of hemagglutination. Applying erythrocytes as an object of study is based on the fact that glycophorin which is located on the surface is identical to glycocalyx of epithelial cells, where the receptors for bacterial adhesion are located (Билалов и др., 2006). During investigation the strain of *L. acidophilus* Er 317/402 "Narine" possessing the highest properties was isolated by means of screening. It was revealed that the most of the studied strains, inclusive *L. acidophilus* Er 317/402 "Narine", *L. delbrueckii subsp. bulgaricus var. mazuni* "Karine", *L. jugurti* Л11п, *Streptococcus lactis* 1304, *S. thermophilus* M7, cause a reaction of hemagglutination of erythrocytes and by that demonstrating high adhesive properties. None of the investigated strains had a hemolytic activity. To understand whether the adhesiveness is due to specific adhesion colonization factors (CFA) of strains, the adhesins of LAB were investigated. It was revealed that the strains as *L. acidophilus* 317/402 "Narine", *L. delbrueckii subsp. bulgaricus var. mazuni* "Karine" had CFA type I adhesins, *S. lactis* 1304 - CFA type II and *L. jugurti*, *S. thermophilus* M7 strains had P type fimbriae. Hence, the different strains belonging to the same genus, have different types of adhesins and, naturally, the adhesiveness becomes strictly strain specific. Of the tested strains, the *L. acidophilus* 317/402 "Narine" strain showed wide-range suppression zone against *B. subtilis* and *P. aeruginosae* (27mm) and relatively low antagonistic activity against *K. pneumoniae* (17-23mm suppression zone). Later it became clear that relatively weak antibacterial activity of majority of LAB against *K. pneumoniae* is due to the existence of high quantity CFA in above mentioned bacteria. During investigations of LAB resistance against antibiotics and the adhesive properties under the influence of

mentioned substances the *L. acidophilus* Er 317/402 “Narine” strain was isolated, with different concentrations of three antibiotics showed high adhesive properties, which is an important precondition for preserving the viability of the bacteria when passing through gastrointestinal tract. In addition, inhibition of bacterial growth with increasing concentrations of antibiotics suggesting that this type of strain does not carry antibiotic resistance genes which were transferred to the pathogenic microorganisms. Consequently, the strain may find application entirely as a probiotic in medicine, pharmaceutical production and dairy products (Meng et al., 2014). The high concentration of NO_3^- ($\leq 2\%$) suppressed the majority of bacterial strains. However, *L. acidophilus* Er 317/402 “Narine” strain survived in similar conditions. It was shown that the nitrates inhibited the ATP-ase reaction taking place in membrane vesicles of *L. acidophilus*. It should be noted that NO_3^- influence on DCCD-sensitive part of ATPase reaction, which indicates that the target of action of these substances is H^+ ions transporting FoF_1 -ATPase complex, since DCCD inhibitor is characteristic for the latter. From the obtained data it can be assumed that FoF_1 -ATP-ase complex might be a target for nitrate ions (KNO_3 , NaNO_3) even at low concentrations. It was revealed that *L. delbrueckii subsp. bulgaricus var. mazuni* “Karine” strain showed resistance and high adhesive properties at high concentrations of sorbic acid. In maximal concentration (2%) the *L. acidophilus* 317/402 “Narine” strain demonstrated adhesion; this makes possible its use in biotechnology, medicine, veterinary and dairy production. The results indicate that *L. acidophilus* 317/402 “Narine” strain endowed with high adhesion properties has an important practical importance and it can be used in prophylactic and therapeutic purposes.