ՀՀ ԳԱԱ «ՀԱՅԿԵՆՍԱՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱ» ԳԱԿ ՊՈԱԿ

ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ ՌՈՒԶԱՆՆԱ ՌԱԶՄԻԿԻ

ՀԱԿԱՄԱՆՐԷԱՅԻՆ ԿԵՆՍԱԱՐԳԱՍԻՔՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ՈՐՈՇ ԱԽՏԱԾԻՆ ՄԱՆՐԷՆԵՐԻ ՎՐԱ

Գ.00.14- «Կենսատեխնոլոգիա» մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

Երևան – 2014

НПЦ «АРМБИОТЕХНОЛОГИЯ» НАН РА ГНКО

АРУТЮНЯН РУЗАННА РАЗМИКОВНА

ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ АНТИМИКРОБНЫХ БИОПРОДУКТОВ НА НЕКОТОРЫЕ ПАТОГЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.00.14 - «Биотехнология»

Ереван – 2014

Ատենախոսության թեման հաստատվել է «Կենսատեխնոլոգիայի ԳՀԻ» ՓԲԸ-ում (ներկայումս ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ):

Գիտական ղեկավար՝ կ.գ.թ. Ֆ.Ն. Տխրունի

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ ՀՀ ԳԱԱ ակադեմիկոս կ.գ.դ. Է.Գ. Աֆրիկյան
ան.գ.թ. Վ.Բ. Գոգինյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ «Սննդամթերքի անվտանգության ոլորտի ռիսկերի գնահատման և վերլուծության գիտական կենտրոն» ՊՈԱԿ

Պաշտպանությունը կայանալու է 2014 թ. դեկտեմբերի 5-ին, ժամը 15^{00}-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 (37410) 65 41 83

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի գրադարանում:
Սեղմագիրն առաքված է 2014 թ. նոյեմբերի 5-ին:

Մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,
կենսաբանական գիտությունների թեկնածու Գ.Ե. Ավետիսովա

Тема диссертации утверждена в ЗАО «НИИ Биотехнологии» (ныне НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА).

Научный руководитель: к.б.н. Ф. Н. Тхруни

Официальные оппоненты: академик НАН РА, д.б.н. Э.Г. Африкян
к.вет.н. В.Б. Гогинян

Ведущая организация: «Научный центр оценки и анализа рисков безопасности пищевых продуктов», ГНКО

Защита диссертации состоится 5 декабря 2014 г. в 15^{00} часов на заседании специализированного совета 018 Биотехнологии ВАК РА при НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА.
Адрес: 0056, РА, г. Ереван, ул. Гюрджяна, 14, тел/факс (37410) 65 41 83.
С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА.
Автореферат разослан 5 ноября 2014 г.

Ученый секретарь специализированного совета,
кандидат биологических наук Г. Е. Аветисова

ԱՇԽԱՏԱՆՔԻ ԸՆԴՀԱՆՈՒՐ ԲՆՈՒԹԱԳԻՐԸ

<u>Ատենախոսության թեմայի արդիականությունը</u>: Էկոլոգիապես մաքուր և անվտանգ սննդամթերք ստանալը անհրաժեշտություն է առաջացրել ստեղծել նոր անվնաս կերային հավելումներ: Եվրոպական Միության երկրներում հրաժարվել են օգտագործել մի շարք հակաբիոտիկներ և աճի խթանիչներ, քանի որ կենդանիների հետսպանդային մթերքները մարդկանց համար երբեմն հանդիսանում են ալերգիկ հիվանդությունների, սննդային տոքսիկոինֆեկցիաների և տոքսիկոզների պատճառ: Համաձայն վերջին ուսումնասիրությունների՝ մարդկանց մոտ ավելացել են սննդային տոքսիկոինֆեկցիաների քանակը, այդ թվում, սալմոնելոզներինը՝ 7, կամպիլոբակտորիոզներինը և իերսինիոզներինը 15 անգամ [Сидаренко, 2002; Панин, Малик, 2006; WHO/FAO, 2009]:

Անասնբուժության մեջ տարբեր հակաբիոտիկների և քիմիական պատրաստուկների օգտագործման հետևանքով խախտվում է մանրէաբանական հավասարակշռությունը, առաջանում է դիսբակտերիոզ: Խախտվում են կենդանիների և թռչունների մարսողական, հորմոնային և իմունային համակարգերը, հանքային նյութերի նյութափոխանակությունը [Andersson et al., 2001; Курушкин, 2007]:

Այսօր այլընտրանքային պատրաստուկներ համարվում են պրոբիոտիկները, որոնք պարունակում են մարսողական համակարգի մանրէների կենդանի կուլտուրաներ: Դրանք օգտագործվում են որպես կենսաբանական ակտիվ հավելումներ, օժտված են աճի խթանման, բուժ–կանխարգելիչ հատկություններով, անվտանգ են, չունեն հակաբիոտիկներին և քիմիոթերապեվտիկ նյութերին հատուկ թերություններ [Малик, Адамов, 2004; Ljungh,Wadstrom, 2006]:

Ներկայումս արդիական են համարվում նոր արդյունավետ պրոբիոտիկ մանրէական շտամների հայտնաբերումը, հետագա հետազոտությունները և ընտրությունները, դրանց նյութափոխանակության նյութերի օգտագործումը: Ավելի հաճախ որպես պրոբոտիկներ օգտագործվում են կաթնաթթվային բակտերիաները (այսուհետև՝ ԿԹԲ), բիֆիդոբակտերիաները, որոնք համարվում են նորմալ միկրոբիոտայի ներկայացուցիչներ [Stern et al., 2008]**:**

<u>Հետազոտության նպատակը և խնդիրները</u>: Սույն ատենախոսության նպատակն է ուսումնասիրել մեր կողմից ընտրված ԿԹԲ-ների և խմորասնկերի կուլտուրալ հեղուկներից (այսուհետև՝ ԿՀ) ստացված մասնակի մաքրված հակամանրէային կենսաարգասիքների (այսուհետև՝ՀՄԱ) ազդեցությունը և մշակել դրանց անասնաբուժությունում օգտագործման եղանակները: Այդ նպատակին հասնելու համար դրվել են հետևյալ խնդիրները՝

- Մշակել ԿԹԲ-ների և խմորասնկերի ԿՀ-ներից հակամանրէային կենսաարգասիքների (ՀՄԱ) ստացման եղանակը՝ մանրէների աճեցում և ԿՀ-ների մաքրում,
- Ուսումնասիրել ԿԹԲ-ների և խմորասնկերի ԿՀ-ներից ստացված կենսաարգասիքների հակամանրէային ազդեցությունը գյուղատնտեսական կենդանիներից և թռչուններից անջատված որոշ ախտածին մանրէների վրա (***in vitro***),

- Ուսումնասիրել ստացված կենսաարգասիքների հակամանրէային ազդեցությունը ATCC® տիպային կուլտուրաների վրա և համեմատել տարբեր հակաբիոտիների հետ,
- Ուսումնասիրել կենսաարգասիքների անվտանգությունը և օգտագործման հնարավորությունները (***in vivo***),
- Իրականացնել գիտաարտադրական հետազոտություններ:

<u>Գիտական նորույթը:</u>

1. Առաջին անգամ մշակվել է խմորասնկերի ԿՀ-ներից իոնափոխանակային քրոմատոգրաֆիայի մեթոդով մասնակի մաքրված կենսաարգասիքների (ՀՄԱ) խտանյութերի ստացումը,
2. Ցույց է տրվել, որ հետազոտված 2 խմորասնկերից ստացված կենսաարգասիքները պարունակում են տարբեր բնույթի հակամանրէային նյութեր,
3. Ցույց է տրվել, որ տարբեր խմորասնկերից ստացված կենսաարգասիքները ունեն տարբեր հակամանրէային ազդեցություն, կախված խմորասնկերի տեսակից,
4. Առաջին անգամ անջատված ԿԹԲ-ների և խմորասնկերի ԿՀ-ներից ստացված կենսաարգասիքների հակամանրէային ազդեցության համեմատական ուսումնասիրություններ են կատարվել գյուղատնտեսական կենդանիներից և թռչուններից մեր կողմից անջատված ախտածին՝ *Salmonella* spp., *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Clostridium* spp., *Streptococcus* spp., *Pasteurella* spp., *Erysipeloid rhusiopathiae, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Shigella* spp., *Enterococcus* spp., *Enterobacter cloacae* մանրէների վրա,
5. Կիրառվել է *L. acidophilus 1991* մանրէների ԿՀ-ից ստացված ՀՄԱ-1 կենսաարգասիքը թռչնաբուծությունում և խոզաբուծությունում որպես կերային հավելում, աղիքային վարակների կանխարգելիչ և սալմոնելոզ, կոլիբակտերիոզ, պաստերելոզ հիվանդությունների բուժման միջոց:

<u>Կիրառական նշանակությունը:</u> Ուսումնասիրությունների արդյունքների հիման վրա ստացված ՀՄԱ–1 կենսաարգասիքը կարող է կիրառվել թռչնաբուծությունում և խոզաբուծությունում որպես արդյունավետ կերային հավելում, աղիքային վարակների կանխարգելիչ, ինչպես նաև, հավերի և խոզերի սալմոնելոզի, կոլիբակտերիոզի, պաստերելոզի բուժամիջոց:

<u>Պաշտպանության ներկայացվող հիմնական դրույթները.</u>

- ԿԹԲ-ների և խմորասնկերի հակամանրէային նյութերի սինթեզի բնութագիրը, ստացված ԿՀ-ների մաքրում իոնափոխանակային քրոմատոգրաֆիայի մեթոդով,
- Որոշ ԿԹԲ-ներից և խմորասնկերից ստացված ՀՄԱ-ների հակամանրէային ազդեցությունների ուսումնասիրությունները կենդանիներից և թռչուններից անջատված ախտածին մանրէների վրա,
- ԿԹԲ-ների և խմորասնկերի ՀՄԱ-ների հակամանրէային համեմատական ազդեցությունների արդյունքները ATCC® տիպային կուլտուրաների և հակաբիոտիկների վրա,

- ԿԹԲ–ներից և խմորասնկերից ստացված ՀՄԱ-ների անվտանգության ուսումնասիրությունները և դրանց ազդեցությունը սալմոնելոզով վարկված մկների վրա (***in vivo***),
- ՀՄԱ–1 կենսաարգասիքի ուսումնասիրությունները թռչնաբուծությունում և խոզաբուծությունում՝ որպես աղիքային վարակների կանխարգելիչ և բուժման միջոց:

Ատենախոսական աշխատանքի կապը գիտական թեմաների հետ: Ատենախոսության հետազոտությունները անցկացվել են՝ ANSEF N 678-NS-biotech (2007) և NATO Sf P 982164 (2007-2009) դրամաշնորհների շրջանակներում, ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում բազային ֆինանսավորմամբ իրականացվող «Հետզոտություններ կենսատեխնոլոգիայի և մանէաբանության բնագավառում» ծրագրի շրջանակներում:

Ատենախոսի անձնական ներդրումը: Հայցորդի անձնական ներդրումը ներառում է ձևակերպված խնդիրների իրականացում, թեմային առընչվող գիտական գրականության ուսումնասիրություն և վերլուծություն, տպագրված գիտական հոդվածների և ատենախոսության ձևակերպում, արդյունքների քննարկում և ամփոփում: Հիմնական խնդիրների դրվածքը և մեթոդների մշակումը իրականացվել է ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի միկրոբային պատրաստուկների լաբորատորիայի վարիչ՝ կ.գ.թ., Ֆ. Ն. Տխրունու ղեկավարությամբ: Աշխատանքի որոշ բաժիններ քննարկվել են նույն կենտրոնի կենսաբանորեն ակտիվ միացությունների անջատման և մաքրման լաբորատորիայի վարիչ՝ ք.գ.դ., Ա. Ե. Աղաջանյանի հետ:

Ատենախոսության քննարկումը: Ատենախոսության հիմնական դրույթները ներկայացվել են միջազգային կոնֆերանսներում՝ «Advanced Biotechnology: Perspectives of development in Armenia», Armenia, Tsakhadzor, 2006, «State-of the-Art Biotechnology in Armenia & ISTC contribution», Armenia, Tsakhkadzor, 2008, Second International Symposium on antimicrobial Peptides «Food veterinary medical and novel applications» France, Saint-Malo, 2009, «Second Balkan Conference on Biology» Bulgaria, Plovdiv, 2010, նաև ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի գիտական խորհրդի նիստերում:

Աշխատանքի իրականացման վայրը: Աշխատանքը իրականացվել է ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի, միկրոբային պատրաստուկների լաբորատորիայում, նույն կենտրոնի կենսաբանորեն ակտիվ միացությունների անջատման և մաքրման լաբորատորիայում, Հանրապետական անասնաբուժական հակահամաճարակային և ախտորոշիչ կենտրոն, ներկայումս՝ Հանրապետական անասնաբուժասանիտարիայի և բուսասանիտարիայի լաբորատոր ծառայությունների կենտրոնի (այսուհետև՝ ՀԱԲԼԾԿ) մանրէաբանության բաժնում: Գիտաարդյունաբերական հետազոտությունները անցկացվել են Կոտայքի մարզի «Գետամեջի» և Արմավիրի մարզի «Արաքս» թռչնաֆաբրիկաներում, Երևանի «Լանդրաս» տոհմային խոզաբուծարանում և այլ ֆերմերային անհատական տնտեսություններում:

Ատենախոսության կառուցվածքը և ծավալը: Ատենախոսությունը կազմված է ներածությունից, գրականության տվյալներից, նյութերից և մեթոդներից, ստացված

արդյունքներից և դրանց քննարկումներից՝ շարադրված 5 գլուխներում, ամփոփումից, եզրակացություններից, կիրառական առաջարկություններից, օգտագործված գրականության ցանկից, որը ներառում է 125 հղումներ և 8 հավելվածներից: Ատենախոսության հիմնական ծավալը կազմում է 119 տպագրական էջ, ներառում է 13 աղյուսակ, 1 սխեմա, 13 նկար:

Հրատարակված գիտական աշխատությունները: Ատենախոսության նյութերի վերաբերյալ հրատարակվել են 8 գիտական աշխատանքներ՝ 1 ՀՀ Արտոնագիր, 4 հոդվածներ, որոնցից մեկն առանց համահեղինակների և 3 միջազգային թեզիսներ:

ԳԼՈՒԽ 1. ԳՐԱԿԱՆ ԱԿՆԱՐԿ

Գրական ակնարկում ամփոփված են ատենախոսության թեմային վերաբերող ժամանակակից գրականության տվյալները, կենդանիների նորմալ և պայմանական ախտածին միկրոբիոտայի ընդհանուր նկարագիրը, կաթնաթթվային բակտերիաների դերը կենդանիների նորմալ միկրոբիոտայում, հակաբիոտիկների ազդեցությունը ախտածին մանրէների վրա, մանրէային պատրաստուկների դասակարգումը, պրոբոտիկների օգտագործումը անասնաբուժության մեջ:

ԳԼՈՒԽ 2. ՆՅՈՒԹԵՐ ԵՎ ՄԵԹՈԴՆԵՐ

2.1. Ուսումնասիրությունների առարկան: Աշխատանքում օգտագործվել են ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի միկրոբային պատրաստուկների լաբորատորիայում աճեցված ԿԹԲ-ներից՝ *Lactobacillus rhamnosus БТК-109 (ИНМИА 9614), Pediococcus pentosus БТК-28 (ИНМИА 9616), Enterococcus faecium БТК-64 (ИНМИА 9620), Lactobacillus plantarum БТК-65 (ИНМИА 9619), Lactobaccilus plantarum БТК-66 (ИНМИА 9618),* և *Kluyveromyces lactis БТХ-412 (ИНМИА 10322), Saccharomycopsis* sp. *БТХ-151 (ИНМИА 10323)* խմորասնկերի շտամեր: Ստացված շտամերը գտնվում են ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի «Մանրէների ավանդադրման կենտրոն»-ում: Հետազոտություններում օգտագործվել է նաև *Lactobacillus acidophilus 1991* (*ВКПМ-6257*) շտամը: ԿԹԲ-ների բոլոր շտամերը պահվել են 40% գլիցերին պարունակող ախտազերծված կաթում –20^{0}C-ում, իսկ խմորասնկերը՝ Սաբուրո ագարի վրա, +4^{0}C-ում:

2.2. ԿԹԲ-ների աճեցում: Աճեցման համար օգտագործվել են MRS (HiMedia) արգանակ հիդրոլիզված կաթով և շիճուկով միջավայրեր [Карапетян, и др., 2008]:

2.3. Խմորասնկերի աճեցում: Աճեցման համար օգտագործվել են Սաբուրո արգանակ (HiMedia), կաթնային շիճուկով հեղուկ սննդարար միջավայր [Хачатрян и др., 2012]:

2.4. Վերնստվածքային հեղուկների ստացում: Համապատասխան միջավայրերում և պայմաններում աճեցնելուց հետո ԿԹԲ-ներից և խմորասնկերից ստացված ԿՀ-ները ցենտրիֆուգվել են 4000 պտ/ր 30 րոպ. տևողությամբ, խտացվել է վերնստվածքային հեղուկները (այսուհետև՝ ՎՆՀ)՝ 0.5 մՊա, 55^{0}C, 30 րոպ:

2.5. Հակամանրէային ակտիվության քանակական հաշվարկ: Հակամանրէային ազդեցության ակտիվությունը հաշվարկվել է համաձայն ընդունված մեթոդի [Parente, et al., 1995]:

2.6. Ախտածին մանրէական կուլտուրաներ: Մեր կողմից անջատվել և իդենտիֆիկացվել են կենդանիների և թռչունների ներքին օրգաններից վարակիչ հիվանդությունների հարուցիչների ախտածին մանրէների կուլտուրաներ՝ *Salmonella* spp., *E. coli, Staph. aureus, Clostridium* spp., *Streptococcus* spp., *Erysipeloid rhusiopathiae, Pasteurella* spp., *Enterococcus* spp., *E. cloacae, Ps. aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Shigella* spp.: Նաև օգտագործվել են՝ *E. coli ATCC© 25922, Staph. aureus ATCC© 25923, Ps. aeruginosa ATCC© 27853, S. typhimurium ATCC© 14028, Cl. perfringens ATCC© 3124, Enteracoccus fecalis ATCC© 29212* տիպային մանրէական կուլտուրաներ:

2.7. Ախտածին մանրէների անջատում և իդենտիֆիկացիա: Ներքին օրգանների նմուշներից ախտածին մանրէների կուլտուրաներ անջատվել են համաձայն մանրէաբանական հետազոտությունների կանոնների [Murray, 2003; Manual of Diagnostic Tests and Vaccines, OIE, 2004; Quinn, et al., 2004; Atlas, 2004]:

2.8. Հակամանրէային ազդեցության որոշում (*in vitro*):

Հետազոտություններն անցկացվել են համաձայն միջազգային NCCLS ստանդարտների [NCCLS document M11–A5, 2001; NCCLS document M100-S12, 2002; NCCLS document M7–A6, 2003; NCCLS document M2–A8, 2003]:

2.9. Կուլտուրալ հեղուկի մաքրում և ՀՄԱ-ների ստացում: ԿՀ-ներից ՀՄԱ-ների մաքրումն ու անջատումն իրականացվել է ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում մշակված իոնափոխանակային մեթոդի համաձայն [Աղաջանյան Ա.Ե., 2006]: Հետազոտված կենսաարգասիքները անվանվել են համաձայն այն մանրէների, որոնց ԿՀ-ից ստացվել են:

2.10. Կենսաարգասիքների լաբորատոր ուսումնասիրություններ (*in vivo*): Ուսումնասիրություններն անցկացվել են սպիտակ մկների վրա՝ օգտագործելով ՀՄԱ-ների օրգանիզմ ներմուծման տարբեր եղանակներ՝ **արտաքին**՝ մաշկի վրա քսուկների ձևով, **ներքին** (***per os***), **ենթամաշկային ներարկումների** միջոցով [Гос. Фармакопея, 1968]:

2.11. Կենսաարգասիքի օգտագործումը գիտաարտադրական հետազոտություններում: ՀՄԱ–1 (*L. acidophilus 1991*) կենսաարգասիքն օգտագործվել է թռչնաբուծությունում՝ Կոտայքի մարզի **«Գետամեջի»** և Արմավիրի մարզի **«Արաքս»** թռչնաֆաբրիկաներում՝ **Արբոր Այկրես** և **KOOB-500** ցեղատեսակների բրոյլերների 1-42 օրական ճտերի վրա: ՀՄԱ–1 կենսաարգասիքն օգտագործվել է նաև խոզաբուծությունում՝ **«Լանդրաս»** Տոհմային խոզաբուծարանում, **լանդրաս** ցեղատեսակի 1-60 օրական խոզերի վրա:

ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐ ԵՎ ՔՆՆԱՐԿՈՒՄՆԵՐ

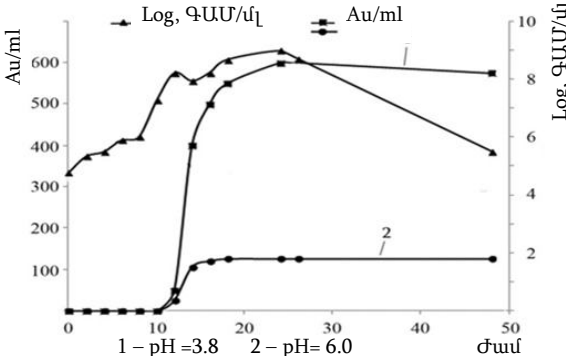
ԳԼՈՒԽ 3. ՀՄԱ-ՆԵՐԻ ՍՏԱՑՄԱՆ ԵՂԱՆԱԿԻ ՄՇԱԿՈՒՄԸ

3.1. ԿԹԲ-ների և խմորասնկերի աճեցումը

Ուսումնասիրել և համեմատել ենք *L. acidophilus 1991, L. rhamnosus БТК-109, E. faecium БТК-64, L. plantarum БТК-65, L. plantarum БТК-66, P. pentosus БТК-28* ԿԹԲ-ների և *K. lactis БТХ-412, Saccharomycopsis* sp. *БТХ-151* խմորասնկերի MRS միջավայրում աճեցման ժամանակ կողմից հակամանէային նյութերի կուտակումը: Նկ. 1-ում ցույց է տրված ԿՀ-ում հակամանրէային նյութերի սինթեզը *L. rhamnosus БТК-109* ԿԹԲ-ի շտամի օրինակով: Ստացված տվյալները ցույց են տալիս, որ *L.*

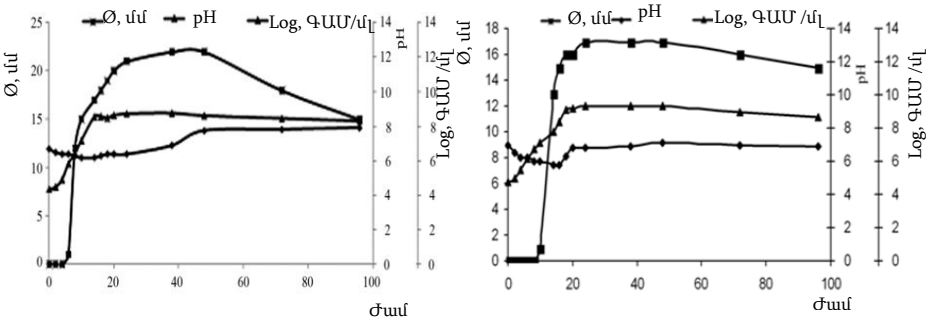
rhamnosus БТК-109 մանրէների հակամանրէային նյութերի սինթեզը նկատվում է աճի լոգարիթմական փուլում 10-20 ժամվա ընթացքում: Նշված ժամանակահատվածից հետո չի նկատվում ընդհանուր հակամանրէային նյութերի (pH=3.8) և բակտերիոցինների (pH=6.0) քանակի ավելացում:

Ստացված ԿՀ-ում (pH=3.8) հակամանրէային ակտիվությունը (AU/ml) աճեցումից հետո կազմում է 600 AU/ml, ինչը կարող է պայմանավորված լինել ԿՀ-ում կաթնաթթվի, դիացետիլենի, պերօքսիդի առկայությամբ, որոնք օժտված են հակամանրէային ակտիվությամբ: ԿՀ-ի հակամանրէային ակտիվությունը (չեզոքցված պայմաններում, pH= 6.0) հավասար է 100 AU/ml, ինչը համաձայն Կլայնխայմերի դասակարգման վկայում է սպիտակուցանման նյութերի (բակտերիոցինների) սինթեզի մասին [Klaenhammer, 1988]:



Նկ. 1 *L. rhamnosus БТК-109* հակամանրէային նյութերի սինթեզը (MRS, 37⁰C)

Նկար 2-ի (ա)-ում և (բ)-ում ցույց է տրված *Saccharomycopsis* sp. *БТХ-151* և *K. lactis БТХ-412* խմորասնկերի աճեցման ժամանակ հակամանրէային նյութերի սինթեզը:



Նկ. 2 Խմորասնկերի հակամանրէային նյութերի սինթեզը (Սաբուրո միջավայր, 30⁰C)
(ա) *Saccharomycopsis* sp. *БТХ-151* **(բ) *K. lactis БТХ-412***

Saccharomycopsis sp. *БТХ-151* (ա) խմորասնկի աճը տեղի է ունենում մինչև 18 ժամը և հետագայում այն շարունակում է մնալ կայուն, իսկ հակամանրէային

նյութերի մաքսիմալ սինթեզը տեղի է ունենում խմորասնկի աճի լոգարիթմական փուլում 50 ժամվա ընթացքում, որից հետո նկատվում է քանակի նվազում: Հնարավոր է, որ դա տեղի է ունենում նյութափոխանակության նյութերի կուտակման հետևանքով: Նկ. 2-ի (բ)-ում ցույց է տրված, որ *K. lactis БТХ-412* խմորասնկի աճը նույն պայմաններում տեղի է ունենում 10-20 ժամվա ընթացքում և հետագայում այն շարունակում է մնալ կայուն: Հակամանրէային նյութերի մաքսիմալ սինթեզը տեղի է ունենում խմորասնկի աճի լոգարիթմական փուլում 10–24 ժամվա ընթացքում և հետագայում հակամանրէային նյութերի քանակի նվազում գրեթե չի նկատվում:

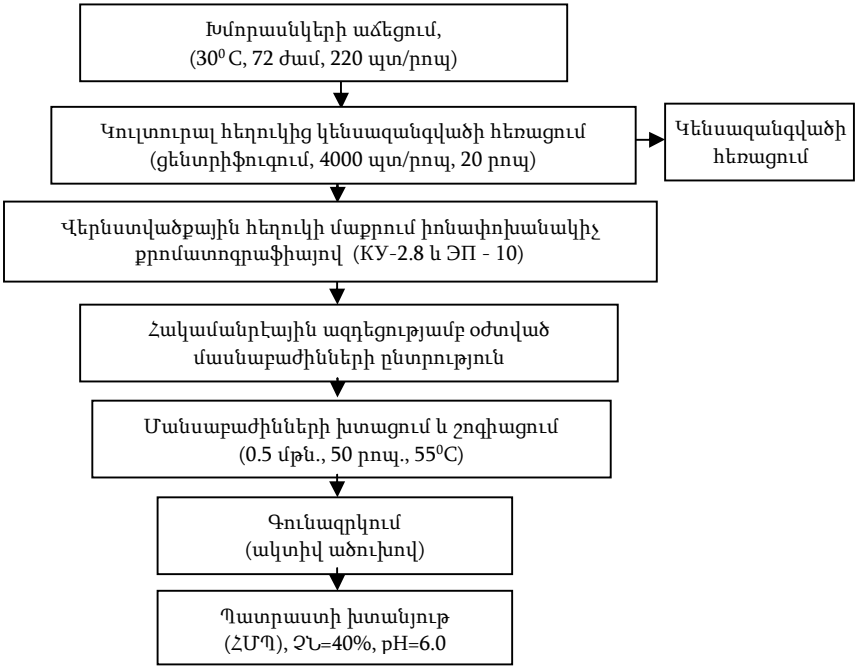
Այսպիսով, համեմատելով հետազոտված *Saccharomycopsis* sp. *БТХ-151* և *K. lactis БТХ-412* խմորասնկերի շտամերի հակամանրէային նյութերի սինթեզը կախված է ուսումնասիրվող խմորասնկերի տեսակներից, տեղի է ունենում աճի լոգարիթմական փուլում, pH=7.0-8.0 տիրույթում և տարբերվում է ժամանակի տևողությամբ: Խմորասնկերից և ԿԹԲ-ներից ստացված ԿՀ-ները ենթարկվել են մաքրման:

3.2 ԿԹԲ-ների և խմորասնկերի կուլտուրալ հեղուկի մաքրում

Թիվ 1 սխեմայում պատկերված է մշակված խմորասնկերից ՀՄԱ-ների մաքրման և ստացման տեխնոլոգիական փուլերը:

Սխեմա 1

Խմորասնկերից հակամանրէային կենսաարգասիքի մաքրման և ստացման տեխնոլոգիական սխեման



Խմորասնկերի ԿՀ-ի մաքրման իոնափոխանակային քրոմատոգրաֆիայի մեթոդը ըստ օգտագործված տեխնոլոգիական սխեմայի ստացվել են մասնակի մաքրված կենսաարգասիքներ: Խմորասնկերից ստացված ՀՄԱ-ների ելքը կազմել է 2-3%, և ունեցել են ՉՆ-ի տարբեր արդյունք կախված մանրէների տեսակից՝ *K. lactis БТХ-412*-ը ՉՆ=23%, *Saccharomycopsis* sp. *БТХ-151*-ը՝ ՉՆ=40%: Նույն մեթոդով մաքրված ԿԹԲ-ների ՀՄԱ-ների ելքը կազմել է 5-6 %, ՉՆ=35-58%՝ կախված մանրէների տեսակից:

Խմորասնկերի ՀՄԱ-ների հակամանրէային նյութերի բնույթը պարզելու համար իոնափոխանակային մեթոդով մաքրելուց հետո խմորասնկերի մասնաբաժինները հետագայում մաքրվել են գել ֆիլտրացիայի եղանակով (Sephadex G-25): Գել ֆիլտրացիայի փուլից հետո ստացվել է խմորասնկերի ՀՄԱ-ների հակամանրէային ազդեցությամբ օժտված մասնաբաժինները խտացվել են: Դրանք խմորասնկերի տեսակից կախված ունեցել են տարբեր ելք, ծավալ և էլյուցիայի ժամանակ: Հայտնի է, որ միկրոցինները կարող են ունենալ սպիտակուցանման բնույթ [Ожован, и др., 2002]: Հակամանրէային նյութերի բնույթը պարզելու համար օգտագործել ենք հիդրոլիզի մեթոդը:

Հիդրոլիզից հետո ՀՄԱ-ների հակամանրէային ազդեցության արդյունքները ներկայացված են թիվ 1 աղյուսակում:

Աղյուսակ 1

Խմորասնկերի ՀՄԱ-ների հակամանրէային ազդեցությունը հիդրոլիզից հետո (թեստ կուլտուրա *Salmonella* spp., Ø, մմ)

№	Խմորասնկերի ՀՄԱ	Հիդրոլիզ	
		առաջ	հետո
	4N H_2SO_4, (90⁰C, 96 ժամ)		
1.	ՀՄԱ-412	11±1.07	0
2.	ՀՄԱ-151	12±1.05	7±1.02
6N HCI , (130⁰C, 2 մթն., 2 ժամ)			
1.	ՀՄԱ-412	8±1.2	0
2.	ՀՄԱ-151	10±1.03	3.5 ±1.09

$p<0.05$, ”0” - հակամանրէային ազդեցությունը բացակայում է

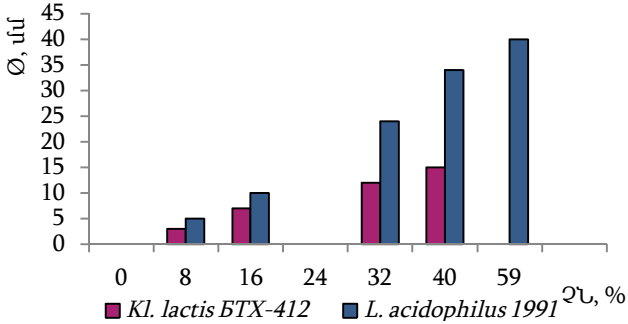
Թիվ 1 աղյուսակում ներկայացված տվյալներից երևում է, որ *K. lactis БТХ-412*-ի ՀՄԱ-412-ը հիդրոլիզից հետո կորցնում է իր հակամանրէային ազդեցությունը: Կարելի է ենթադրել, որ հիդրոլիզի արդյունքում հակամանրէային նյութերը քայքայվում են: Սա վկայում է, որ հակամանրէային ազդեցություն ունեցող նյութերը կարող են ունենալ սպիտակուցանման բնույթ: Իսկ *Saccharomycopsis* sp. *БТХ-151* խմորասնկի ՀՄՊ-151-ի հակամանրէային ազդեցությունը հիդրոլիզից հետո նվազում է , ինչը ենթադրում է, որ բացի սպիտակուցանման բնույթի նյութերից այն իր մեջ կարող է պարունակել նաև հակամանրէային ազդեցություն ունեցող այլ բնույթի նյութեր (օրինակ՝ գլիկոպրոտեիններ և գլիկոլիպիդներ), որոնք դիմացկուն են հիդրոլիզի նկատմամբ [Golubev, et al., 1998]: Այդ հատկությունը ցույց է տրված հիդրոլիզի երկու մեթոդների կիրառությամբ:

ԳԼՈՒԽ 4. ՀՄԱ-ՆԵՐԻ ԼԱԲՈՐԱՏՈՐ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐՆ *IN VITRO* ԵՎ *IN VIVO*

4.1. ՀՄԱ-ների ազդեցությունը կախված տարբեր գործոններից (*in vitro*)

Ուսումնասիրությունների ընթացքում օգտագործվել են իոնափոխանակային քրոմատոգրաֆիայի մեթոդով մասնակի մաքրված ԿԹԲ-ների և խմորասնկերի ԿՀ-ից ստացված տարբեր խտության պարունակությամբ ՀՄԱ-ներ:

Նկ. 3–ում պատկերված են տարբեր խտության (ՉՆ, %) *L. acidophilus 1991* ԿԹԲ-ի ՀՄԱ-1 և *Kl. lactis БТХ-412* ՀՄԱ-151 խմորասնկի ԿՀ-ներից ստացված և կենսաարգասիքների հակամանրէային ազդեցության համեմատական տվյալները սկավառակների դիֆուզիայի մեթոդով *Salmonella* spp.-ի նկատմամբ: *L. acidophilus 1991*- ը օգտագործվել է որպես մոդել, քանի որ բնութագրված են նրա հատկությունները [Мкртчян, 2005]:



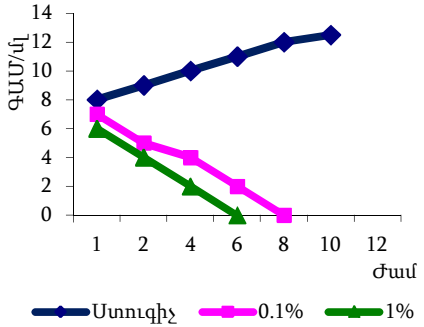
Նկ. 3 Տարբեր խտության ՀՄԱ-ների համեմատական հակամանրէային ազդեցությունը (թեստ կուլտուրա *Salmonella* spp., Ø, մմ)

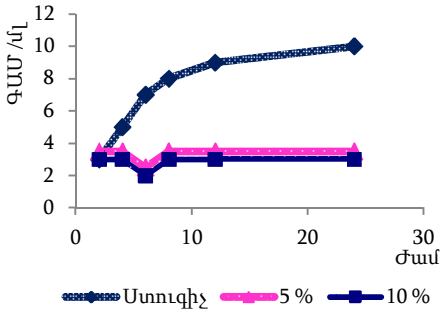
Ինչպես երևում է նկ. 3-ից, *K. lactis БТХ-412* խմորասնկից ստացված ՀՄԱ-412-ը (ՉՆ=40%) առաջացնում է ավելի փոքր տրամաչափերի կասեցման գոտիներ (15մմ), իսկ *L. acidophilus 1991* ԿԹԲ-ից ստացված ՀՄԱ-1-ը (ՉՆ=40%)՝ 2 անգամ ավելի մեծ (35 մմ): *Saccharomycopsis* sp. *БТХ-151* խմորասնկից և այլ ԿԹԲ-ներից ստացված ՀՄԱ-ներում ևս նկատվել է հակամանրէային ազդեցության ուղղակի կախվածություն խտության ՉՆ(%) պարունակությունից և մանրէների տեսակից:

Պետք է նշել, որ *K. lactis БТХ-412* խմորասնկից ստացված ՀՄԱ-412 կենսաարգասիքի ազդեցությամբ թերմոստատում 37^{0}C երկարատև պահպանման ժամանակ (72 ժամ) նկատվում է աճի կասեցման գոտիների տարածման երևույթներ, մանրէների երկրորդային աճ չի դիտվում: Նմանատիպ հատկություն նկատվել է նաև ԿԹԲ-ներից ստացված ՀՄԱ-ների ազդեցությամբ: *Saccharomycopsis* sp. *БТХ-151* խմորասնկից ստացված ՀՄԱ-151 կենսաարգասիքը ցուցաբերում է ՀՄԱ-412-ին համարժեք հակամանրէային ազդեցություն: Ստացված արդյունքները կրկին հաստատում են խմորասնկերի կողմից սինթեզվող տարբեր բնույթի հակամանրէային նյութերի մասին (տես ԳԼՈՒԽ 3):

Ուսումնասիրվել են ՀՄԱ–1 և ՀՄԱ-151 կենսաարգասիքների խտանյութերի հակամանրէային ազդեցությունները ախտածին *Salmonella* spp. մանրէների վրա (նկ. 4 (ա) և (բ)): Երևում է, որ ՀՄԱ-1 կենսաարգասիքի 1 % լուծույթը ամբողջությամբ

կասեցրել է մանրէների աճը արդեն 6 ժամվա ընթացքում, իսկ 0.1% լուծույթները զրոյական արդյունքներ են ցուցաբերում 8 ժամվա ընթացքում:





Նկ. 4 ՀՄԱ-ների հակամանրէային ազդեցությունը (թեստ կուլտուրա *Salmonella* spp. , ԳԱՄ/մլ)

(ա) ՀՄԱ–1 (ԿԹԲ, ՉՆ=58%) (բ) ՀՄԱ-151 (խմորասունկ, ՉՆ=28%)

Ուսումնասիրվել է ՀՄԱ-151 (ՉՆ=23%) կենսաարգասիքի 5 և 10% լուծույթները նույն պայմաններում (*Salmonella* spp., 10^8 ԳԱՄ/մլ) և պարզվել է, որ հետազոտվող լուծույթները 5 ժամվա ընթացքում նվազեցրել են մանրէների քանակը 2 աստիճանով և հատագա 24 ժամերի ընթացքում փոփոխություններ չեն նկատվել: Հետազոտությունների արդյունքները վկայում են այն մասին, որ *L. acidophilus 1991* ԿԹԲ-ից ստացված ՀՄԱ-1 կենսաարգասիքը ցուցաբերում է բակտերիցիդ հատկություն, իսկ *Saccharomycopsis* sp. *БТХ-151* խմորասնկից ստացված ՀՄԱ-151 կենսաարգասիքը՝ բակտերիոստատիկ հատկություններ: ՀՄԱ-412 կենսաարգասիքի տարբեր խտության լուծույթները ախտածին *Salmonella* spp. մարէների վրա ևս ցուցաբերել են բակտերիոստատիկ հատկություն:

Այսպիսով, ուսումնասիրված ԿԹԲ-ից և խմորասնկերից ստացված ՀՄԱ-ների հակամանրէային ազդեցությունը կախված է տարբեր գործոններից՝ ՉՆ(%) պարունակությունից, լուծույթների խտությունից, օգտագործված մանրէների սեռից և ցուցաբերում են համապատասխանաբար բակտերիցիդ և բակտերիոստատիկ հատկություններ:

4.2. ՀՄԱ-ների ազդեցությունը տարբեր ախտածին մանրէների վրա

Ուսումնասիրվել և համեմատվել են ստացված ԿԹԲ-ի ՀՄԱ-1 և խմորասնկերի՝ ՀՄԱ-412 և ՀՄԱ-151 կենսաարգասիքների հակամանրէային ազդեցությունը կենդանիներից անջատված մանրէական կուլտուրաների վրա: Կենսաարգասիքները օգտագործվել են միևնույն ՉՆ=40% պարունակությամբ և նույն քանակով (10 մկլ): Հետազոտությունների արդյունքերը բերված են աղյուսակ 2-ում:

Ամփոփելով հետազոտությունների ընթացքում ստացված տվյալները (աղ. 2) պարզվել է, որ *L. acidophilus-1991* ԿԹԲ-ից ստացված ՀՄԱ-1 կենսաարգասիքը ցուցաբերել է առավել բարձր արդյունավետություն, ավելի մեծ տրամաչափերով կասեցման գոտիներ, քան *K. lactis БТХ-412* խմորասնկց ստացված ՀՄԱ-412 և

Saccharomycopsis sp. *БТХ-151*–ից ստացված ՀՄԱ-151 կենսաարգասիքները: Սակայն, խմորասնկերից ստացված կենսաարգասիքներն ունեցել են տարբեր հակամանրէային ազդեցություն հետազոտվող ախտածին մանրէների վրա: Հակամանրէային ազդեցության տարբերությունները կարող են պայմանավորված լինել նաև ախտածին մանրէների աճի տարբեր արագություններով և միևնույն սեռի մանրէների տարբեր շտամերի միջև եղած տարբերությամբ [Ермоленко Е., и др., 2008]:

Աղյուսակ 2

Կենսաարգասիքների հակամանրէային ազդեցությունը ախտածին մանրէների վրա, Ø, մմ

Մանրէներ	Աղբյուրը									
	խոզ	թռչուն	ԽԵԿ	ճագար	ՄԵԿ	ԽԵԿ	ՄԵԿ	ԽԵԿ	թռչուն	խոզ
	E. coli	*E. coli*	*E. coli*	*Shigella* spp.	*Shigella* spp.	*Shigella* spp.	*Cl. perfringens*	*Cl. perfringens*	*E. cloacae*	*E. cloacae*
ՀՄԱ-1	13±1.03	12±1.01	11±1.03	10±1.07	12±1.80	11±0.9	10±0.89	10±0,9	14±1.04	12±1.05
ՀՄԱ-412	0	12±0.70	6±1.02	9±1.03	2.5±0.94	0	9±0.85	7±1,02	0	0
ՀՄԱ-151	10±1.40	12±0.80	0	0	6±0.74	0	8±0.84	5±0,74	11±1.06	10±1.04

’0” - հակամանրէային ազդեցություն բացակայում է

Ելնելով տվյալներից՝ երևում է, որ իոնափոխանակիչ քրոմատոգրաֆիայի մեթոդի օգտագործմամբ ստացված մասնակի մաքրված ԿԹԲ-ների և խմորասնկերի ՀՄԱ-ները ճնշում են կենդանիներից և թռչուններից անջատված ախտածին մանրէների աճը:

4.3. ՀՄԱ-ների և հակաբիոտիկների համեմատական ազդեցությունը տիպային մանրէների վրա

Ուսումնասիրվել և համեմատվել են՝ *L. acidophilus 1991* ԿԹԲ-ից ստացված ՀՄԱ-1 կենսաարգասիքի 5% լուծույթի (ՉՆ-ի վերահաշվարկով 20 μg) և էնրոֆլոքսացին, տետրացիկլին, ստերպտոմիցին, էրիթրոմիցին, լևոմիցետին հակաբիոտիկների հակամանրէային հատկությունները ATCC® մանրէների վրա: Հետազոտությունների արդյունքում ստացված տվյալները բերված են թիվ 3 աղյուսակում:

Հետազոտությունների արդյունքում պարզվել է, որ մեր կողմից ստացված ՀՄԱ-1 կենսաարգասիքն օգտագործվող քանակով (20 μg) իր հակամանրէային հատկություններով ոչ միայն չի զիջում անասնաբուժությունում վարակիչ հիվանդությունների բուժման համար լայն կիրառություն ունեցող հակաբիոտիկներին, այլև, որոշ հակաբիոտիկների հետ համեմատած, գերազանցում է այդ հակաբիոտիկների հակամանրէային ազդեցությունը:

Աղյուսակ 3

Կենսաարգասիքի (ՀՄԱ–1) և հակաբիոտիկների համեմատական ազդեցությունը ATCC® մանրէների վրա, Ø, մմ

Անվանում	Չափա բաժին, μg	*ATCC® 27853 Ps. aeruginosa*	*ATCC® 25922 E. coli*	*ATCC® 14028 S. typhimurium*	*ATCC® 13124 Cl. perfringens*
ՀՄԱ–1	20	22±1.0	21±1.03	20±1.20	20±0.98
ՀՄԱ-412	40	7±1.56*	0	11±1.02**	18±0.78
Էնրոֆլոքսացին	15	15±0.9*	19±1.2***	20±1.02	25±0.98***
Տետրացիկլին	30	9±1.3**	12±1.01*	13±0.9*	0
Ստրեպտոմիցին	10	11±1.02**	12±1.0*	13±1.03*	0
Էրիթրոմիցին	15	0	0	0	0
Լևոմիցետին	30	0	20±1.3****	15±1.5***	0

”0” -հակամանրէային ազդեցությունը բացակայում է ,

*p = 0.002, **p = 0.001, ***p = 0.01, ****p = 0.2 (համեմատությունը ՀՄՊ-1-ի հետ)

K. lactis БТХ-412 և *Saccharomycopsis* sp. *БТХ-151* խմորասնկերից ստացված ՀՄԱ-412 և ՀՄԱ-151 կենսաարգասիքների հակամանրէային ազդեցությունը համեմատվել է *L. acidophilus 1991* ԿԹԲ-ից ստացված ՀՄԱ-1 կենսաարգասիքի հետ:

Աղյուսակ 4-ից երևում է, որ ՀՄԱ–1 կենսաարգասիքը ցուցաբերել է առավել լավ արտահայտված հակամանրէային ազդեցություն՝ բոլոր օգտագործված մանրէների վրա: *K. lactis БТХ-412* խմորասնկից ստացված ՀՄԱ-412 կենսաարգասիքը հակամանրէային ազդեցություն ցուցաբերել է միայն *Ps. aeruginosa ATCC® 27853* և *S. typhimurium ATCC®14028* մանրէների վրա և հակամանրէային ազդեցություն չի արձանագրվել *E. coli ATCC® 25922, E. fecalis ATCC®29212, S. aureus ATCC®25923* մանրէների վրա: *Saccharomycopsis* sp. *БТХ-151* խմորասնկից ստացված ՀՄԱ-151 կենսաարգասիքը ցուցաբերել է հակամանրէային ազդեցություն *E. coli ATCC®25922, Staph. aureus ATCC®25923, Ps. aeruginosa ATCC®27853, S. typhimurium ATCC®14028* մանրէների վրա և չի ցուցաբերել հակամանրէային ազդեցություն *E. fecalis ATCC®29212* մանրէների վրա:

Աղյուսակ 4

Կենսաարգասիքների համեմատական ազդեցությունը ATCC® մանրէների վրա, Ø, մմ

Անվանումը	Չափա բաժին, μg	*ATCC® 27853 Ps. aeruginosa*	*ATCC® 25922 E. coli*	*ATCC® 29212 E. fecalis*	*ATCC® 14028 S. typhimurium*	*ATCC® 25923 Staph. aureus*
ՀՄԱ – 1	20	22±1.20	21±0.90	20±1.02	20±1.30	21±0.99
ՀՄԱ– 412	40	7±1.56*	0	0	11±1.02**	0
ՀՄԱ– 151	20	10±1.04*	11±0.95*	0	12±1.08**	10±1.00*

*p = 0.001, **p = 0.002 (համեմատությունը ՀՄԱ-1-ի հետ)

”0”- հակամանրէային ազդեցությունը բացակայում է

Այսպիսով, ցույց է տրվել, որ խմորասնկերից ստացված կենսաարգասիքները համակամանրէային ազդեցություն կարող են ցուցաբերել ոչ միայն տիպային մանրէների (ATCC), այլ նաև՝ կենդանիներից և թռչուններից անջատված ախտածին մանրէների վրա:

4.4. ՀՄԱ–1 կենսաարգասիքի անվտանգության հետազոտությունների արդյունքները (*in vivo*)

Հայտնի է, որ կենսաարգասիքների օգտագործման համար անհրաժեշտ է իրականացնել դրանց անվտանգության հետազոտություններ: ՀՄԱ–1 (ՉՆ=59%) կենսաարգասիքի 0,01%, 0,1%, 1%, 10% լուծույթները արտաքինից օծվել են սպիտակ մկների **թաթիկներին, մաշկին, թիկնային մակերեսին**: Հետազոտության 14 օրերի ընթացքում ՀՄԱ–1 կենսաարգասիքի լուծույթներով օծված հատվածներում արտաքինից մաշկի վրա չեն նկատվել կարմրություն, այտուց, նեկրոզ, արյունազեղում, մեռուկացում կամ այլ փոփոխություններ: Հետազոտության 14 օրերի ընթացում բոլոր կենդանիները եղել են նորմալ, կերից և ջրից չեն հրաժարվել: ՀՄԱ–1 կենսաարգասիքի նույն խտության լուծույթները սպիտակ մկներին տրվել է 0.5 մլ, 1.0 մլ, 1.5 մլ չափաբաժիններով՝ **ներքին ներմուծմամբ** (***per os***): Կենսաարգասիքը խմեցնելուց հետո առաջին 1-2 ժամերի ընթացքում փորձակենդանիների մոտ շոկային երևույթներ, ջղակծկումներ և անկումներ չեն նկատվել: Հետազոտության 14 օրերի ընթացում բոլոր կենդանիները եղել են նորմալ, կերից և ջրից չեն հրաժարվել: Մաքրված ՀՄԱ-1 կենսաարգասիքի նույն խտության լուծույթները 0.5 մլ չափաբաժինով **ենթամաշկային ներարկվել են** սպիտակ մկներին: Ներարկումներից հետո մկների մոտ շոկային երևույթներ չեն արձանագրվել: Ներարկման հատվածներում ախտաբանական փոփոխություններ՝ կարմրություն, այտուց, նեկրոզ, խոցեր չեն դիտվել: Փորձակենդանիները փորձերի ընթացքում մնացել են նորմալ, անկումներ չեն գրանցվել:

Այսպիսով, հետազոտությունների արդյունքները ցույց են տվել, որ ստացված ՀՄԱ–1 կենսաարգասիքն անվնաս է ներքին և արտաքին ներմուծման ժամանակ: Տարբեր խտության լուծույթները հետազոտության օրերին սպիտակ մկների մոտ ախտաբանական փոփոխություններ չեն առաջացրել:

4.5. ՀՄԱ-1 կենսաարգասիքի օգտագործման եղանակները (*in vivo*)

Առանձնահատուկ հետաքրքրություն է առաջացրել ՀՄԱ-1 կենսաարգասիքի ուսումնասիրությունները սալմոնելոզ հիվանդության ժամանակ, հաշվի առնելով նրա տարածվածությունը Հայաստանի Հանրապետությունում, համաձայն մեր կողմից կատարված հետազոտությունների արդյունքների: Ուսումնասիրությունների համար առանձնացվել են 20 գրամանոց սպիտակ մկներից բաղկացած տարբեր խմբեր: Խմբերը բաժանվել են ստուգիչի և փորձնականի:

Փորձնական խմբերի մկներին ***per os*** տրվել է 1% ՀՄԱ–1 (ՉՆ=50%), համապատասխանաբար՝ 0.01 մկլ, 0.1մկլ, 1.0 մկլ չափաբաժիններով և վարակվել են *Salmonella* spp. 24 ժամանոց արգանակային կուլտուրայով (0,3 մլ, որը համապատասխան է 10^8 ԳԱՄ/մլ քանակին, **ենթամաշկային ներարկմամբ**): Փորձի ընթացքը տևել է 10 օր: Հետազոտությունների արդյունքում *Salmonella* spp.

կուլտուրայով վարակված և ՀՄԱ-1 ստացած մկները պահպանել են իրենց կենսունակությունը ՀՄԱ–1 ստանալու հետևանքով: Ստուգիչ խմբի մկները, որոնք չեն ստացել ՀՄԱ–1 և վարակված են եղել փորձարկվող կուլտուրայով՝ փորձերի ընթացքում սատկել են 100 % և նրանց ներքին օրգաններից անջատվել են *Salmonella* spp. մանէներ:

Հետագայում փորձարկվել է ՀՄԱ-1 կենսաարգասիքը սալմոնելոզի կանխարգելման նպատակով կիրառելու համար: **Նախապես 3 անգամ** ՀՄՊ-1-ի 1% լուծույթ (ՉՆ= 58%) ***per os*** տալուց հետո սպիտակ մկները վարակվել են *Salmonella* spp. կուլտուրայով՝ 0.3 մլ ենթամաշկային ներարկմամբ: Հետազոտությունների ընթացքը տևել է 14 օր: Արդյունքները բերված են աղյուսակ 5-ում:

Աղյուսակ 5

ՀՄԱ-1-ի ազդեցությունը սալմոնելոզով վարակված մկների վրա (*in vivo*)

Խմբեր	n	Հետազոտության օրեր								
		1	2	3	4	5		6	7	14
		ՀՄԱ-1, մլ			*Salmonella* spp., մլ	Անկումներ		Անկումներ		
						քանակ	%			
Ստուգիչ 1	10	0.01	0.01	0.01	-	0	0	0	0	0
Ստուգիչ 2	10	0.1	0.1	0.1	-	0	0	0	0	0
Ստուգիչ 3	10	-	-	-	0.3	10	**100**	0	0	0
Խումբ 4	10	0.01	0.01	0.01	0.3	100	**10**	0	0	0
Խումբ 5	10	0.1	0.1	0.1	0.3	0	0	0	0	0

"-" - ոչինչ չի տրվել

Ինչպես երևում է աղյուսակ 6-ից **նախապես 0.01 մլ** ՀՄԱ ստացած մկների խմբում անկումները կազմել են 10 %, իսկ 0.1 մլ ՀՄԱ ստացած մկների խմբում անկումներ չեն նկատվել, նրանք կենսունակությունը պահպանել են 100 %:

Կարելի է ենթադրել, որ հետազոտվող ՀՄԱ-ները օժտված են նաև իմունային համակարգը կարգավորող հատկությամբ և բարձրացնում են մկների դիմադրողականությունը, որը կանխում է սալմոնելոզով վարակումը:

ԳԼՈՒԽ 5. ԳԻՏԱՀԵՏԱԶՈՏԱԿԱՆ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

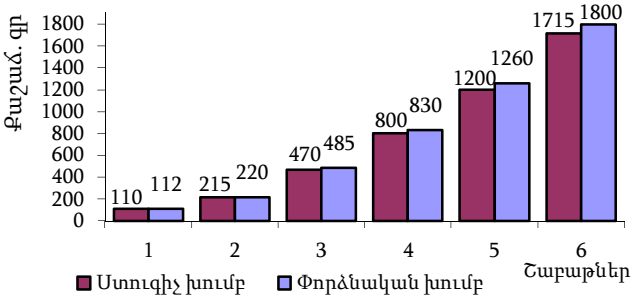
5.1. ՀՄԱ-1 կենսաարգասիքի հետազոտությունները թռչնաբուծությունում

Ներկայումս անասնապահությունում մեծ առաջընթաց է ստացել կերակրման և անասնաբուժական կանխարգելիչ միջոցառումների տեխնոլոգիայում ֆունկցիոնալ կերային հավելումների օգտագործումը [Тараканов, и др., 2005; Бондаренко, 2006; Кощаев, 2008; Грачева, Лыско, 2008]:

Կանխարգելում: ՀՄՊ-1 կենսաարգասիքի հետազոտություններն անցկացվել են **«Գետամեջի»** թռչնաֆաբրիկայում կատարված հաջորդ փորձերի ընթացքում ՀՄԱ–1 կենսաարգասիքը (ՉՆ=58%) ուսումնասիրվել է թիվ 10 **հատակային** պահվածքի թռչնանոցում առանձնացված 1 օրական առողջ Արբոր Այկրես ցեղի թռչունների վրա:

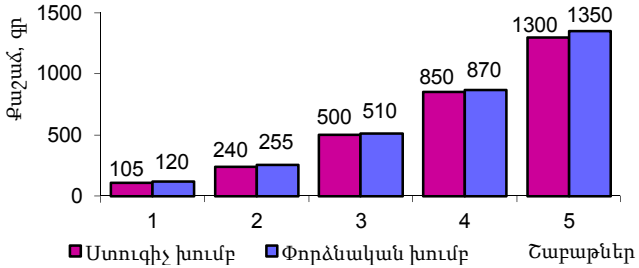
Հետազոտությունների համար առանձնացվել են 200 գլուխ թռչուններ՝ փորձնական և ստուգիչ խմբերի համար: 100 գլուխ փորձնական խմբի գլխաքանակին տրվել է ՀՄԱ-1 կենսաարգասիքի 5% լուծույթ, 5 օր շարունակ: Որպես ստուգիչ խումբ առանձնացված մյուս 100 գլուխ թռչունները կենսաարգասիք չեն ստացել: Այս գլխաքանակի թռչունները ստամոքս-աղիքային հիվանդությունների կանխարգելման համար ստացել են հակաբիոտիկներ: Թռչունները կշռվել են յուրաքանչյուր յոթերորդ օրը: Փորձի ընթացքը տևել է 42 օր:

Թիվ 5 նկ.-ում պատկերված են հետազոտությունների արդյունքները: Փորձերի ավարտին քաշաճի տարբերությունը կազմել է 75 գր, որը կազմում է 4.96%: Հատակային պահվածքի ժամանակ անկումների քանակը ստուգիչ խմբում կազմել է 6.6%, իսկ փորձնականում՝ 1%:



Նկ. 5 ՀՄԱ-1-ի ազդեցությունը թռչունների քաշաճի վրա («Գետամեջի» թռչնաֆաբրիկա, հատակային պահվածք)

ՀՄԱ–1 կենսաարգասիքը նույն մեթոդով ուսումնասիրվել է նաև **«Գետամեջի»** թռչնաֆաբրիկայի թիվ 6 **վանդակային** պահվածքի թռչնանոցում (նկ.6.) առանձնացված 1 օրական առողջ **Արբոր Այկրես** ցեղի 85-ական գլուխ թռչունների նկատմամբ: Փորձերի ավարտին տարբերությունը կազմել է 50 գր, որը կազմում է 4%: Անկումների քանակը փորձի ավարտին վանդակային պահվածքի թռչնանոցում կազմել են ստուգիչում 8%, իսկ փորձնականում՝ 2,3%:



Նկ. 6 ՀՄԱ-1-ի ազդեցությունը թռչունների քաշաճի վրա («Գետամեջի» թռչնաֆաբրիկա, վանդակային պահվածք)

Նմանատիպ հետազոտություններ են անցկացվել նաև **«Արաքս»** թռչնաֆաբրիկայի թիվ 8 **վանդակային** պահվածքի թռչնանոցում՝ 1 օրական **KOOB-500** ցեղի 200-ական գլուխ բրոյլերների վրա: Թռչունների քաշաճի տարբերությունը

կազմել է 130 գր, այսինքն՝ 7.8%: Հետազոտությունների ժամանակահատվածում փորձնական խմբի թռչունների մոտ նկատվել են 2,6% անկումներ, իսկ ստուգիչում՝ 4%:

Բուժում: Հետազոտությունն անցկացվել է **«Արաքս»** թռչնաֆաբրիկայում: **«Արաքս»** թռչնաֆաբրիկայում սովորաբար սալմոնելոզի և կոլիբակտերիոզի բուժման համար օգտագործվում է էնրոֆլոքսացին հակամանրէային պատրաստուկը՝ 5 օր, խմելու ջրին խառնված: Առանձնացված են 100 գլուխ տուգիչ խմբի հիվանդ թռչուններին տրվել է էնրոֆլոքսացին՝ ընդունված դեղաչափերով: **Հատակային** պահվածքի թռչնանոցում առանձնացվել են 18–20 օրական սալմոնելոզով և կոլիբակտերիոզով հիվանդ 200 գլուխ KOOB-500 ցեղի ճտեր և հետազոտության ընթացքում տրվել է ՀՄԱ–1 կենսաարգասիքը (ՉՆ=52%)՝ 10% լուծույթի ձևով, 3 օր շարունակ, ջրի հետ խառնված, յուրաքանչյուր գլխին 1 մլ չափաբաժնով: Հակամանրէային այլ պատրաստուկներ փորձի կատարման ընթացքում բուժման նպատակով չեն օգտագործվել: Փորձարկումների ժամանակահատվածում առողջացել են փորձարկվող թռչունների 95%, անկումները սալմոնելոզ հիվանդությունից կազմել են 5%: Ստուգիչ խմբում անկումների քանակը կազմել է 20%:

Այսպիսով, առաջարկվում է օգտագործել *L. acidophilus 1991* ԿԹԲ-ի շտամից ստացված ՀՄԱ-1 կենսաարգասիքի 5% և 10% լուծույթները թռչունների աղիքային վարակների **կանխարգելման** և **բուժման միջոց**:

5.2. ՀՄԱ-1 կենսաարգասիքի հետազոտությունները խոզաբուծությունում

Հետազոտություններն իրականացվել են Երևանի **«Լանդրաս»** ՏԽ-ում: Հետազոտությունների համար առանձնացվել են լանդրաս տեսակի խոզամայրերը՝ իրենց նորածին խոճկորներով. 1 օրական 20 գլուխ նորածին խոճկորներ (մայրերից չառանձնացված)՝ փորձնական և 20 գլուխ նորածին խոճկորներ (մայրերից չառանձնացված)՝ ստուգիչ խմբերի համար:

Կանխարգելում և բուժում: Փորձնական խմբի կենդանիներին 10 օր անընդմեջ տրվել է (***per os***) 5% ՀՄԱ-1 կենսաարգասիքի լուծույթ (ՉՆ=50%)՝ յուրաքանչյուր գլխին 1մլ/1կգ կենդանի քաշի հաշվով: Այս խմբի կենդանիներին ստամոքսաղիքային հիվանդությունների կանխարգելման նպատակով հակաբիոտիկ պատրաստուկներ չեն տրվել: Ստուգիչ գլխաքանակի կենդանիներին փորձնական օրերի ընթացքում կանխարգելիչ նպատակով տրվել են հակաբիոտիկ պատրաստուկներ: Փորձի արդյունքները բերված են թիվ 6 աղյուսակում:

Փորձի ավարտին փորձնական խմբի կենդանիների քաշը կազմել է 13.1–15.2 կգ, իսկ ստուգիչ խմբինը՝ 10.5-13.2 կգ: Հետազոտության ընթացքում փորձնական խմբի կենդանիների մոտ ստամոքս-աղիքային վարակների կլինիկական նշաններ, ջերմության բարձրացում, լուծ, թուլություն, ախորժակի անկում, ինչպես նաև անկումներ չեն նկատվել:

Բուժման համար փորձնական խմբի կենդանիներին 5 օր անընդմեջ տրվել է (***per os***) 10% ՀՄԱ-1 կենսաարգասիքի լուծույթ (ՉՆ=50%)՝ յուրաքանչյուր գլխին 1մլ/1կգ կենդանի քաշի հաշվով, 3 օր:

Աղյուսակ 6

ՀՄԱ-1-ի ազդեցությունը խոզերի քաշաճի վրա («Լանդրաս» ՏԽ)

Խմբեր	Քաշաճի տարբերություն, կգ	
	1 շաբաթ անց	2 ամիս անց
Ստուգիչ խումբ	1.15	11.85
Փորձնական խումբ	1.35	14.15
Տարբերություն, կգ	0.2	2.3
Տարբերություն, %	17.3	19.4

Այսպիսով, հայտնի են թռչունների և կենդանիների վարակիչ հիվանդությունների բուժման և կանխարգելման համար կենդանի մանրէների՝ պրոբիոտիկների, օգտագործման տարբերակներ: Դրանց օգտագործումը երկարատև է, երբեմն 35-45 օր, և անհրաժեշտ են պահպանման հատուկ պայմաններ: Սակայն, մեր կողմից ստացված և հետազոտված ՀՄԱ-ները 3 օր օգտագործելով կարելի է բուժել վարակիչ հիվանդությունները և կրկնակի վարակման դեպքում չի առաջանում հիվանդություն: ՀՄԱ-ները հնարավոր է պահպանել սենյակային ջերմաստիճանում և դրանք երկարատև պահպանման ժամանակ չեն կորցնում իրենց հատկությունները:

ԿԻՐԱՌԱԿԱՆ ԱՌԱՋԱՐԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

1. Առաջարկվում է օգտագործել *L. acidophilus 1991* ԿԹԲ-ի շտամից ստացված ՀՄԱ-1 կենսաարգասիքը՝ որպես խոզերի և թռչունների աղիքային վարակների կանխարգելման միջոց, օգտագործելով 5% լուծույթը, 5-7 օրվա ընթացքում, 1մլ/կգ կենդանի քաշի հաշվով, խմելու ջրի հետ
2. Առաջարկվում է օգտագործել *L. acidophilus 1991* ԿԹԲ-ի շտամից ստացված ՀՄԱ-1 կենսաարգասիքը որպես խոզերի և թռչունների աղիքային վարակների, մասնավորապես՝ սալմոնելոզների, կոլիբակտերիոզի, պաստերելոզի, բուժման միջոց, օգտագործելով 10% լուծույթը, առաջին օրը երկու անգամ, երկրորդ և երրորդ օրերին միանվագ՝ 1մլ/կգ կենդանի քաշի հաշվով:
3. Առաջարկվում է օգտագործել խմորասնկերից ստացված ՀՄԱ-ները որպես բակտերիստատիկ հատկություն ունեցող նյութ:

ԵԶՐԱԿԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

1. Առաջին անգամ հետազոտվել են մեր կողմից ստացված ԿԹԲ-ների (n=6) և խմորասնկերի (n=2) ԿՀ-ներից մասնակի մաքրված ՀՄԱ-ների հակամանրէային ազդեցությունները կենդանիների և թռչունների ախտածին և պայմանական ախտածին մանրէների վրա,
2. Առաջին անգամ ցույց է տրվել, որ ՀՄԱ-ների հակամանրէային ազդեցությունների արդյունավետությունը կախված է մաքրման մեթոդից, կենսաարգասիքի խտությունից, քանակից, հետազոտվող շտամերի բնույթից,
3. Ցույց է տրվել ԿԹԲ-ներից ստացված ՀՄԱ-ները ունեն բակտերիցիդ հատկություն, խմորասնկերից ստացված ՀՄԱ-ները՝ բակտերիոստատիկ հատկություն,

4. Առաջին անգամ ցույց է տրվել, որ ԿԹԲ-ներից ստացված ՀՄԱ-ները ախտածին մանրէների վրա ցուցաբերում են որոշ հակաբիոտիկներին համարժեք հակամանրէային ազդեցություն, որ ԿԹԲ-ներից և խմորասնկերից ստացված ՀՄԱ-ների ազդող նյութը կարող է ունենալ սպիտակուցանման բնույթ,
5. Ցույց է տրված ՀՄԱ-1 կենսաարգասիքի կիրառման անվտանգությունը in vivo պայմաններում
6. Ցույց է տրված խոզերի և թռչունների աղիքային վարակների կանխարգելման և բուժման համար օգտագործման հնարավորությունները:

Ատենախոսության թեմայի շրջանակներում տպագրված աշխատությունների ցուցակ

1. **Ռ.Ռ. Հարությունյան**, Ֆ.Ն. Տխրունի, Շ.Ս. Վարդապետյան, Տ.Վ. Խաչատրյան, L. acidophilus 1991 կաթնաթթվային բակտերիայից ստացված պատրաստուկի հակամանրէային հատկությունների ուսումնասիրությունը // Ագրոգիտություն, 2006, № 5-6, էջ 245-251
2. **Harutyunyan R.R.,** Tkhruni F.N., Karapetyan K.D. Study of the potential use of the L. acidophilus derived antimicrobial preparation in veterinary // International Conference "Advanced Biotechnology: Perspectives of development in Armenia". Armenia, Tsakhadzor, 2006, July 12-14, P. 68
3. **Ռ.Ռ. Հարությունյան**, Սալմոնելոզի տարածվածության ուսումնասիրությունը Հայաստանի Հանրապետությունում // Ագրոգիտություն, 2007, № 3-4, էջ 149-152
4. **Harutyunyan R**.R, Tkhruni F. N., Agadjanyan A.E., Balabekyan C.R., Avagyan Yu. I., Ileev I. Influence of preparations with microbial origin on the development of chickens // International Conference: "State-of the-Art Biotechnology in Armenia & ISTC contribution". Armenia, Tsakhkadzor, 2008, September 28 - October 02, P. 220
5. Tkhruni F., **Harutyunyan R.,** Aghayan A. The effect of partially purified supernatants of some new lactic acid bacteria // Second International Symposium on antimicrobial Peptides "Food veterinary medical and novel applications". France, Saint-Malo, 2009, June 17-19, P.191
6. **Հարությունյան Ռ.Ռ**., Տխրունի Ֆ.Ն., Բաղդասարյան Ա. Ս., Հակամանրէային կենսապատրաստուկի օգտագործման հնարավորությունների ուսումնասիրությունը թռչնաբուծությունում // Ագրոգիտություն, 2009, № 7-8, էջ 347-352
7. Karapetyan K., Huseynova N., **Arutjunyan R.,** Tkhruni F., Haertle Th. Perspective of using new strains of lactic acid bacteria for biopreservation. // J. Biotechnol. and Biotechnol. Second Balkan Conference on Biology. Bulgaria, Plovdiv, 2010, May 21-23, P. 460-464
8. ՀՀ Արտոնագիր № 2378 A, Խոզերի և թռչունների աղիքային հիվանդությունների բուժման և/կամ կանխարգելման եղանակ/ **Հարությունյան Ռ.Ռ.,** Տխրունի Ֆ.Ն., Աղաջանյան Ա.Ե., 25.06.2010 - 4 էջ:

АРУТЮНЯН РУЗАННА РАЗМИКОВНА

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ АНТИМИКРОБНЫХ БИОПРОДУКТОВ НА НЕКОТОРЫЕ ПАТОГЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ

РЕЗЮМЕ

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, дрожжи, патогенные бактерии животных, антимикробные биопродукты, свиньи, птицы, лечение и профилактика заболеваний.

Широкое распространение в глобальном масштабе резистентных и особенно мультирезистентных форм микроорганизмов к действию различных антибиотиков вызвало необходимость изыскания качественно новых антимикробных средств и противоинфекционных препаратов. Одним из преспективных направлений в этой области явилось изыскание и применение пре- и пробиотиков, метабиотиков как альтернатива антибиотиков.

Исследовали и сравнивали антимикробное влияние полученных частично очищенных биопродуктов (АМП), из культуральных жидкостей (КЖ) некоторых штаммов МКБ (n=6) и дрожжей(n=2). В работе использовали выделенные нами штаммы МКБ*: Lactobacillus rhamnosus БТК-109 (ИНМИА 9614), Lactobacillus acidophilus 1991 (ВКПМ-6257), Pediococcus pentosus БТК-28 (ИНМИА 9616), Lactobacillus plantarum БТК-65 (ИНМИА 9618), Lactobacillus plantarum БТК-66 (ИНМИА 9619), Enterococcus faecium БТК-64 (ИНМИА 9620)* и дрожжей: *Kluyveromyces lactis БТХ-412 (ИНМИА 10322), Saccharomycopsis sp. БТХ-151 (ИНМИА 10323).* Для получения АМП из супернатантов КЖ были применены методы ионообменной хроматографии и гельфильтрации.

Показано, что синтез антимикробных веществ в КЖ МКБ на примере *Lactobacillus rhamnosus* БТК-109 при выращивании на среде MRS происходит в течении 10-20 часов в логарифмической фазы роста и при конечном значении КЖ pH=3.8 составляет 600 AU/ml. При определении антимикробной активности при значении КЖ pH=6.0- составляет 100 AU/ml. По классификации Клайнхаймера [Klaenhammer, 1988] антимикробная активность КЖ при pH=6.0 свидельствует о синтезе антимикробных веществ белковой природы (бактериоцинов). Синтез антимикробных веществ исследуемыми штаммами дрожжей *Saccharomycopsis* sp. БТХ-151 при выращивании на среде Сабуро происходит в логарифмической фазе роста с 10 часов и продолжается до 45 часов. После чего количество антимикробных веществ уменьшается. Синтез антимикробных веществ дрожжей *Kl. lactis* БТХ-412 на среде Сабуро происходит в логарифмической фазе роста в течении 10-30 часов. Максимальный синтез антимикробных веществ происходит в течении 10-24 часов. Дальше уровень накопления антимикробных веществ не изменяется. Таким образом, динамика синтеза антимикробных веществ дрожжами зависит от вида дрожжей.

Полученные супернатанты КЖ дрожжей были очищены методом ионообменной хроматографии с использованием ионообменных смол КУ-2.8 и ЭДЭ–10 П.

Полученные биопродукты из МКБ имеют pH=4,0-4,5, а из дрожжей- pH=5,5-6,0. Содержание сухих веществ (СВ) АМП полученных из МКБ составляет 50-58%, а АМП из дрожжей- 20-40%, без содержания неорганических солей и цветных пигментов. Выход фракций с антимикробной активностью различается у исследуемых штаммов МКБ и дрожжей.

Полученные частично–очищенные биопродукты из КЖ были очищены методом гель фильтрации (Sephadex G25). Были выделены фракции с антимикробной активностью, которые у разных МКБ и дрожжей отличались по количеству, обьему, по антимикробной активности. Наибольший объем и количество фракций с антимикробной активностью из исследуемых штаммов отмечен у штаммов *Lactobacillus acidophilus* 1991, *Lactobacillus rhamnosus* БТК-109, *Saccharomycopsis sp.* БТХ-151.

Проведенные исследования показали, что полученные антимикробные биопродукты из КЖ бактерий и дрожжей имеют широкий спектр антимикробной активности против патогенных бактерии сельскохозяйственных животных и птиц из органов которых они были выделены *Salmonella sp., E. coli, Staph. aureus, Clostridium sp., Streptococcus sp., Pasteurella sp., Erysipeloid rhusiopathiae, Enterococcus sp., E. cloacae, Ps. aeruginosa, Shigella sp.*: Различную антимикробную активность АМП бактерий и дрожжей проявляли на АТСС тест культурах таких как: *Ps. aeruginosa* ATCC® 27853, *E. coli* ATCC® 25922, *S. typhimurium* ATCC® 14028, *Cl. perfringens* ATCC® 13124. Получены данные, которые свидетельствуют о том, что действие АМП на патогенные штаммы сравнимо с действием антибиотиков. Действие АМП-1 (20 μg) сравнимо с действием антимикробного препарата энрофлоксацина (15 μg) и более эффективно по сравнению с другими– эритромицин, стрептомицин.

Показано что АМП, полученные из КЖ исследуемых бактерий проявляют бактериоцидный эффект, а АМП полученное после очистки КЖ дрожжей– бактериостатический эффект.

Показано, что использование АМП-1 при внешнем воздействии на кожу и подкожном введении белым мышам- безвредно. В процессе проведения исследований, зараженные *Salmonella* spp. группа мышей, которые получали биопродукт сохраняют свою жизнеспособность, а группа мышей, которые не получали биопродукт погибают- 100 %. При повторном (через 2 месяца) заражении выживших мышей *Salmonella* spp.- мыши не заболевают. Можно допустить, что содержащийся в АМП-1 антимикробное вещество имеет имуномодулирующее свойство, что способствует повышению сопротивляемости животного.

Получены положительные результаты в ходе выполнения исследований на птицефабриках “Аракс” Армавирского района на птицах породы КООВ-500 и “Гетамечи” Котайского района на бройлерах Арбор Айкресс, на свиноводческой ферме “Ландрас“ на породе свиней ландрас и в дворовых хозяйствах. В процессе исследований показано, что используемый АМП-1 имеет лечебное свойство и способствует увеличению привеса у птиц и свиней. Таким образом, используя АМП-1, возможно проведение лечения и профилактики ряда заболеваний без использования

антибиотиков у птиц и свиней, что в итоге должно привести к уменьшению передачи заболеваний человеку.

RUZANNA RAZMIK HARUTYUNYAN

STUDY OF THE EFFECT OF ANTIMICROBIAL BIOPRODUCTS ON SOME PATHOGENIC BACTERIA

SUMMARY

Keywords: *lactic acid bacteria, yeast, animal pathogenic bacteria, antimicrobial bioproducts, pigs, birds, disease treatment and prevention*

The broad and large-scale distribution of forms of microorganisms resistant to various antibiotics, and particularly that of multi-resistant forms of microorganisms initiated the screening and practical implementation of qualitatively new antimicrobial means and anti-infections medicines. The screening and application of pre- and probiotics are promising alternatives to antibiotics.

Within the framework of the research, the effect properties of partially purified bioproducts obtained from culture liquids (CL) of certain strains of LAB (n=6) and yeast (n=2) were studied and compared. The works included cultivation of strains of lactic acid bacteria *Lactobacillus rhamnosus БТК-109 (ИНМИА 9614), Lactobacillus acidophilus 1991 (ВКПМ-6257), Pediococcus pentosus БТК-28 (ИНМИА 9616), Lactobacillus plantarum БТК-65 (ИНМИА 9618), Lactobacillus plantarum БТК-66 (ИНМИА 9619), Enterococcus faecium БТК-64 (ИНМИА 9620)*, as well as yeast *Kluyveromyces lactis BTK-412 (INMIA 10322)* and *Saccharomycopsis* sp. *BTK-151 (INMIA 10323)*, isolation and purification of culture liquids (ion-exchange chromatography and gel filtration biotechnology methods) to obtain AMPs.

On the example of *Lactobacillus rhamnosus BTK-109*, it was shown that synthesis of antimicrobial substances by LAB on MRS medium started from 10 to 20 h of the logarithmic phase of growth and at the finite value of pH=3.8 the activity of CL was 600 AU/ml. The antimicrobial activity of CL at pH=6.0 was 100 AU/ml. According to the Klaenhammer classification [Klaenhammer, 1988], the antimicrobial activity of CL at pH=6.0 proved synthesis of antimicrobial substances of proteinaceous nature (bacteriocins). Synthesis of antimicrobial substances by the investigated yeast strains *Saccharomycopsis sp. BTK-151* on the Saburo medium started in the logarithmic phase of growth from 10 to 45 h, followed by the quantitative decrease of antimicrobial substances. Synthesis of antimicrobial substances of yeast *Kluyveromyces lactis BTK-412* on the Saburo medium started in the logarithmic phase of growth from 10 to 30 h. Maximum synthesis of antimicrobial substances was observed within 10-24 h. Then the level of antimicrobial sysbstnaces accumulation did not change. Thus, the dynamics of synthesis of antimicrobial substances by yeasts depends on yeast species.

Obtained supernatants from CL yeast were purified by ion-exchange chromatography using ion-exchange resins КУ-2.8 and ЭДЭ–10 П. The pH level of preparations was

pH=4.0-4.5 for preparations obtained from LAB and pH=5.5-6.0 for those obtained from yeast. The dry matter (DM) contents for LAB and yeast were 50-55% and 20-40%, respectively, not containing inorganic salts and color pigments. Yield fractions with antimicrobial activity varies in the studied strains of yeast and LAB.

Obtained partially purified bioproducts of CL were purified by gel filtration (Sephadex G25). Fractions were isolated from the antimicrobial activity are different from the LAB and yeasts by quantity, yield, antimicrobial activity. The largest volume and the number of fractions with antimicrobial activity of the test strains was observed in *Lactobacillus acidophilus 1991*, *Lactobacillus rhamnosus BTK-109, Saccharomycopsis sp. BTX-151* strains.

The studies showed that isolated and purified AMPs had a wide spectrum of antimicrobial activity against pathogens isolated from organs of farm animals and birds such as *Salmonella sp., E. coli, Staph. aureus, Clostridium sp., Streptococcus sp., Pasteurella sp., Erysipeloid rhusiopathiae, Enterococcus sp., E. cloacae, Ps. aeruginosa, Shigella sp.*. LAB and yeast preparations demonstrated various antibacterial activity against *ATCC* test cultures, such as *Ps. aeruginosa* ATCC® 27853, *E. coli* ATCC® 25922, *S. typhimurium* ATCC® 14028, *Cl. perfringens* ATCC® 13124. The resulting data confirm that the effect of AMPs towards pathogenic strains is comparable to the effect of antibiotics. The effect of AMP-1 (20 μg) compared to the antimicrobial action of enrofloxacin (15 μg) and more efficient than others- erythromycin, streptomycin.

It is shown that AMPs obtained from LAB culture liquid demonstrate bactericidal effect, while the AMPs obtained from purified culture liquid of yeast have bacteriostatic effect.

It is shown that during experiments by effects on the skin and subcutaneous introductions AMP-1 preparation was safe for white mice. Mice infected with *Salmonella* spp. and treated with AMP-1 preserved their vitality, while mortality rate among mice infected with the same pathogen but not treated with AMP-1, reached 100%. Repeated infection of survivor mise (after 2 months) with *Salmonella* spp. showed that mice did not get ill. It can be assumed that antimicrobial agent contained in the AMP-1 possesses immune modulating property, which increases the resilience of the animal. Can be assumed that contained in AMP-1 antimicrobial agent has immunomodulate property that enhances resistance to the animal.

The positive results of laboratory studies extended an opportunity to conduct AMP-1 preparation trials. These trials were conducted at the Araks Poultry (Armavir marz) using KOOB-500 birds and at Getamej Poultry (Kotayk marz) using Arbor Acres broiler chicken; "Landras" Pedigree Pig Farm using *Landrace* breed, as well as chicken in several households. The studies have shown that the preparation demonstrated a curative effect on these diseases and contributed to the 5% weight gain of birds and pigs. Thus, AMP-1 preparation can be used to treat and prevent a number of contagious diseases in animals and birds without antibiotics, and as a result reduce transmission of infections from animals to humans.