

Биолог. журн. Армении, 1-2 (57), 2005

УДК 576 8(088.8)

ԲՈՒՅՍԵՐԻ ԷՊԻՖԻՏ ՍԻԿՐՈՖԼՈՐԱՅԻՑ ԵՎ ԿԱԹՆԱՄԹԵՐՔՆԵՐԻՑ ՖԱԳԱԿԱՅՈՒՆ ԿԱԹՆԱԹՅՎԱՅԻՆ ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ՍՏԱՑՈՒՄԸ

Լ.Յ. ՀԱՎՈՐՅԱՆ

ՀՀ ԳԱԱ Սիկրոբիոլոգիայի ինստիտուտ, 378510, ք. Արովյան

Ուսումնասիրվել է կաթնամթերքներից և բույսերի էպիֆիտ միկրոֆլորայից մեկուսացված կաթնաթթվային ստրեպտակոկների, ձողածների, ինչպես նաև ագիդոֆիլային բակտերիաների ֆագերի նկատմամբ դիմացկունությունը, կայունությունը, ֆագոլիզիսի առկայությունը: Որոշվել է նաև ԱՊՀ և Հայաստանում ՍՊԸ-ի կողմից արտադրվող *Lactobacillus acidophilus* 317/402 «Նարինե», ինչպես նաև նրա որոշ պրոբիոտիկների հաբերի, փոշի-սրվակներով, կապսուլաներով ֆագավարակվածությունը:

Исследована фагоустойчивость, фагочувствительность, а также фаголизис молочнокислых стрептококков и палочковидных бактерий, выделенных из эпифитной микрофлоры растений и кисломолочных продуктов, а также ацидофильных бактерий и их пробиотиков: сухой порошок в флаконах, в капсулах и др., производимых в кооперативах СНГ и Армении.

The phagostability, phagosensibility and phagolysis of rodoform and streptococci form lactic acid bacteria isolated from epiphytic microflora of plants and acido-lactic products as well as acido-lactic bacteria have been studied.

The phagocontamination of dry powder liquid probiotics and capsules of "Narine" produced in Armenia and other countries as well as in acidophilic bacteria and in strain *Lactobacillus acidophilus* 317/402 "Narine" has been tested.

Lactobacillus acidophilus «Նարինե» պատրաստուկներ -
ֆագադիմացկունություն - ֆագակայունություն - ֆագավարակվածություն

Ֆագերը վիրուսներ են, որոնք ի տարբերություն բուսական և կենդանական վիրուսների պարագիտում են բակտերիաներին, սպանելով նրանց, լուծելու (լիզիս), քայքայելու եղանակով [2]:

Կաթնամթերքների արտադրության ժամանակ շատ հաճախ նկատվում է կաթի չմակարդվելու երևույթը: Ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ կաթնաթթվային բակտերիաների զարգացման 3-4 ժամում տեղի են ունենում պրոցեսներ, որոնց հետևանքով կաթը չի մակարդվում, կամ մակարդված կաթը ջրիկանում է: Այդ երևույթը կարելի է բացատրել բակտերիաֆագերի ազդեցությամբ [1]:

Բակտերիաֆագերի ազդեցությունը կաթնաթթվային բակտերիաների վրա կարող է լինել մասնակի կամ լրիվ: Մասնակի դեպքում կաթնաթթվային բակտերիաների ոչ բոլոր քանակներն են լիզիսի ենթարկվում, մնում են միայն ֆագակայուն բջիջները: Սակայն այս դեպքում կաթնաթթվային խմորման ընթացքը դանդաղում է [10]:

Ոչ բոլոր դեպքերում են, որ ֆագերը թափանցելով կաթնաթթվային բակտերիաների մեջ կարող են պահպանվել, կարող են և ոչնչանալ բջջում: Արտադրության մեջ կաթնաթթվային բակտերիաների կիրառության ժամանակ օգտագործում են այնպիսի շտամներ, որոնք դիմացկուն են ֆագերի նկատմամբ:

Ավելի շատ ենթակա են ֆագոլիզիսի - մեկ շտամով արտադրվող կաթնամթերքները: Բակտերիոֆագերի կործանարար ազդեցությունը տարբեր կաթնամթերքների արտադրության ժամանակ տարբեր է: Բակտերիոֆագերը շատ մեծ վնաս են հասցնում պանիրների, հատկապես էմենտալ տիպի, արտադրությանը: Շատ պանիրներ բակտերիոֆագերի առկայությամբ դառնահամ լինելու պատճառով խոտանվում են [8]:

Վերջին տարիներին գրականության մեջ ի հայտ են եկել տվյալներ, որ բացի կաթնաթթվային ստրեպտոկոկերից բակտերիոֆագով կարող են վարակվել նաև ծողածև ակտիվ թթու արտադրող տեսակները *Lactobacillus helveticus*, *L. lactis*, *L. acidophilus* և այլն [13]:

Սակայն շատ հեղինակներ ժխտում են կաթնաթթվային ացիդոֆիլային բակտերիաների մոտ բակտերիոֆագի երևույթը: Գտնում են, որ շատ թթու և լործ արտադրողները ֆագակայուն են [4]: Մի խումբ գիտնականներ էլ գտնում են, որ ացիդոֆիլային կաթնաթթվային բակտերիաները իրենց բջջի թաղանթում չունեն թեյխոնիկ թթու և բջջի շուրջը առանձնացնում են լործնային կապսուլ, որը պաշտպանում է նրանց ֆագերի հարվածից [13]:

Բնության մեջ ֆագերը տարածված են ամենուրեք: Ավելի շատ տարածված են պոլիվալենտ ֆագերը, որոնք կարող են լիզիսի ենթարկել 8-10, երբեմն 20 շտամների միաժամանակ:

Բակտերիոֆագերի դեմ պայքարելու համար մի շարք եղանակներ են մշակվել: Սննդամիջավայրում պակասեցնում են Ca-ի քանակը, որի հետևանքով թուլանում է ֆագերի ադսորբցիան բակտերիալ բջջի վրա, կամ սովորական կաթին ավելացնում են իմունային կաթ, այն կովերից, որոնք նախօրոք իմունացվել էին [3]: Սակայն դեռևս չկան երաշխիքներ բակտերիոֆագերի դեմ: Կաթի արտադրության համար ամենալավ պայքարը բակտերիոֆագերի դեմ կաթնաթթվային բակտերիաների ռեզիստենտ և զգայուն շտամների սելեկցիան է:

Ինչպիսի դեր ունեն բակտերիոֆագերով վարակված կաթնամթերքները մարդկանց ստամոքսա-աղիքային համակարգի բիոցենոզում կաթնաթթվային բակտերիաների զարգացման վրա: Գտնում են, որ ֆագերով վարակված կաթնամթերքները մարդկանց ստամոքսա-աղիքային համակարգում ստամոքսահյութի, լեղու, ենթաստամոքսային գեղձի արտադրված նյութերի հետևանքով նրանք ոչինչանում են [11]:

Հեղինակների մի խումբ գտնում են, որ ֆագերով վարակված կաթնամթերքները ստամոքսա-աղիքային համակարգում նույն դերն են կատարում նրանք լիզիսի են ենթարկում բիոցենոզի կաթնաթթվային բակտերիաներին, որի հետևանքով ընկնում է միջավայրի թթվությունը, այդ ժամանակ գլուխ են բարձրացնում հիվանդածին միկրոօրգանիզմները, որոնք ճնշում են շատ թե քիչ պահպանված բիոցենոզի օգտակար միկրոֆլորային, առաջացնելով դիսբակտերիոզ [5, 9]:

Նյութ և մեթոդ: Ուսումնասիրության համար վերցրել ենք բույսերի էպիֆիտ և կաթնամթերքների միկրոֆլորայից մեր կողմից մեկուսացված կաթնաթթվային ստրեպտոկոկեր, ծողածև

բակտերիաներ, ինչպես նաև ագիդոֆիլային կաթնաթթվային բակտերիաներ, նրանցից որոշ պատրաստուկներ «Նարինե» -ի հաբեր, կապտուկավորված (պատիճավոր) փոշիներ, չոր փոշի և հեղուկ: Կաթնաթթվային ստրեպտակոկերի ֆագակայունությունը, ֆագադիմացկունությունը նրանց մեջ որոշել ենք համամիութենական կաթնաարդյունաբերության գիտահետազոտական ինստիտուտում (ВНИИ), իսկ ծողածև բակտերիաների և պատրաստուկների ֆագի առկայությունը և կայունությունը որոշել ենք խմորող միկրոօրգանիզմների լաբորատորիայում (ԻՆՄԻԱ): Կաթնաթթվային ստրեպտակոկերի, ագիդոֆիլային բակտերիաների ֆագակայունությունը, ֆագոլիզիսը որոշել ենք պատրաստի ֆագային ֆիլտրատներով (Սոսկվա), իսկ նոր մեկուսացված կաթնաթթվային ագիդոֆիլային բակտերիաների ֆագադիմացկունությունը որոշել ենք մեր կողմից պատրաստված ֆագային ֆիլտրատներով [10, 12]: Սոնովալենտ և պոլիվալենտ ֆագերի ֆիլտրատների ստացումը կատարել ենք ըստ Յակովկի եղանակի [12]

Արդյունքներ և քննարկում: Ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ բույսերի էպիֆիտ միկրոֆլորայից մեկուսացված կաթնաթթվային ստրեպտակոկերը ավելի շատ են վարակված բակտերիոֆագերով, քան կաթնամթերքներից մեկուսացվածները (աղ. 1): Դա ըստ երևույթին պետք է բացատրել նրանով, որ բույսերի էպիֆիտ միկրոֆլորայում շատ են տարածված բակտերիոֆագերը և նրանցով վարակված կաթնաթթվային բակտերիաները: Մինչդեռ կաթնամթերքներում բակտերիոֆագերի քանակը լինում է սահմանափակ կամ չի լինում մի շարք պատճառներով 1) կաթնաթթվային խմորման հետևանքով արտադրված կաթնաթթուն ճնշում է բակտերիոֆագերի զարգացումը, 2) կաթնամթերքներում եղած տարբեր տեսակի կաթնաթթվային բակտերիաները ունենում են տարբեր աստիճանի հակաբիոտիկ հատկություններ և կարող են հակաբիոտիկ ազդեցություն ունենալ ֆագերի վրա: Բացի դրանից կաթում կարող են լինել բնական հակաբիոտիկ, ինչպես նաև անասուններին ներարկած հակաբիոտիկ, քիմիաթերապևտիկ պատրաստուկներ, կերից անցած թունաքիմիկատներ (ֆոսֆորօրգանական, քլորօրգանական), իմունային նյութեր, որոնք ճնշում են ֆագերի զարգացումը:

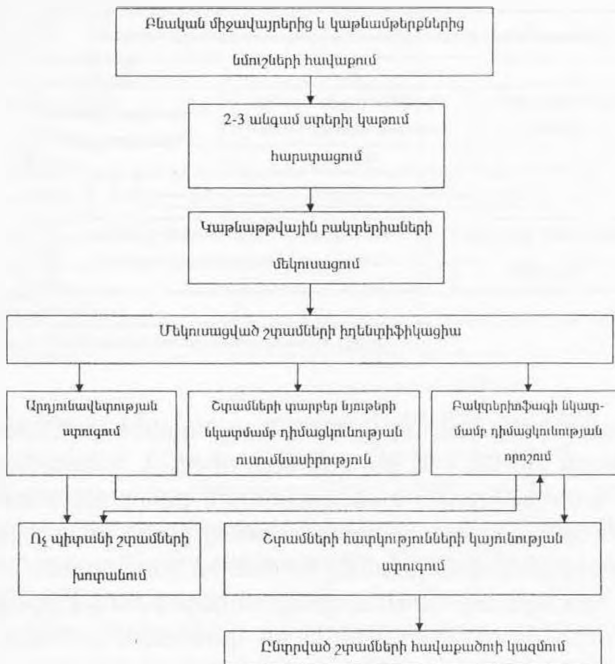
Աղյուսակ 1. Կաթնամթերքներից, բույսերի էպիֆիտ միկրոֆլորայից մեկուսացված կաթնաթթվային բակտերիաների ֆագոլիզիսի ենթարկված և ֆագոկայուն շտամները

Կաթնաթթվային ստրեպտակոկեր	Մեկուսացված շտամների ընդհանուր քանակը	Կաթնաթթվային ստրեպտակոկերի քանակը			
		Ֆագոլիզիսի ենթարկված		Ֆագոկայուն	
		Բույսերի էպիֆիտ միկրոֆլորա	Կաթնամթերք	Բույսերի էպիֆիտ միկրոֆլորա	Կաթնամթերք
<i>Streptococcus thermophilus</i>	99	50	27	3	19
<i>Streptococcus diacetilactis</i>	23	12	6	2	3
<i>Streptococcus lactis</i>	56	30	18	2	6
<i>Lbm. mazuni</i> N2 «Կարինե» (ՍՄՀ-9603)	1	-	-	-	1
<i>Streptococcus thermophilus</i> * Մ ₇ (ՍՄՀ - 9608)	1	-	-	-	1

* - Մեկուսացված են նոր եղանակով:

Կաթնամթերքներից և բույսերի էպիֆիտ միկրոֆլորայից մեկուսացվել են 850 կաթնաթթվային ստրեպտոկոկների շտամներ: Ուսումնասիրվել է նրանց մորֆոֆիզիոլոգիական, կուլտուրալ, կենսաքիմիական հատկությունները և ընտրվել է 178 շտամ, որոնք դասակարգվել են որպես *Str. thermophilus*, *Str. lactis*, *Str. diacetylactis* տեսակներին (սխեմա 1): Նրանցից համակցված մակարոններ, հատկապես թթվասերի համար, պատրաստելու համար, որոշել ենք մի շարք հատկությունների հետ, նաև նրանց ֆագոդիմացկունությունը, ֆագոառկայությունը, ֆագոլիզիսը: Պարզվել է, որ այդ ընտրված շտամների մեծամասնությունը վարակված են եղել ֆագերով, ֆագոդիմացկուն չեն, ենթարկվում են ֆագոլիզիսի (աղ. 1): Բացի դրանից այդ շտամների մեծամասնությունը սառնարանում պահպանելու ընթացքում նորից ենթարկվել էին լիզիսի: Բնականաբար այդ շտամները խոտանվել են:

Սխեմա 1. Բույսերի էպիֆիտ միկրոֆլորայից և կաթնամթերքներից կաթնաթթվային բակտերիաների ստացումը ըստ ընդունված եղանակների

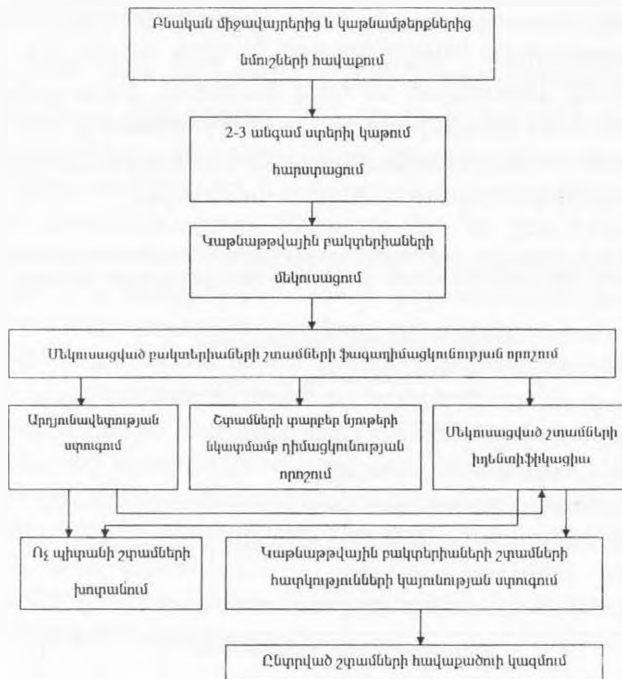


Կաթնաթթվային բակտերիաների մեկուսացման, ինչպես նաև արտադրա-արժեքավոր հատկություններով օժտված և ֆագակայուն, ֆագոդիմացկուն շտամներ ստանալու համար մենք օգտագործել ենք բնական սելեկցիայի եղանակը:

Տարբեր միջավայրերից բույսերի էպիֆիտ միկրոֆլորա, կաթնամթերքներից կաթնաթթվային բակտերիաներ մեկուսացնելուց և մի քանի վերացանքս կաթի մեջ կատարելուց հետո, որոշել ենք նրանց ֆագակայունությունը, ֆագի առկայությունը, ֆագոլիզիսը, ֆագի տիտրը, ֆագի չափավոր, թե վիրուլենտ լինելը և ընտրել ենք սելեկցիայի եղանակով այնպիսի շտամներ, որոնք

Ֆագակայուն են, նոր հետո կատարել ենք մորֆո-ֆիզիոլոգիական, կուլտուրալ, կենսաքիմիական ուսումնասիրություններ, դասակարգել ըստ տեսակների և ընտրել արտադրա-արժեքավոր շտամներ (սխեմա 2):

Սխեմա 2. Բույսերի էպիֆիտ միկրոֆլորայից և կաթնամթերքներից կաթնաթթվային ֆագակայուն բակտերիաների ստացումը



Ուսումնասիրել ենք նաև մեր կողմից մեկուսացված *Lactobacillus acidophilus*-ի հեղինակային 13, 92, L-2, ինչպես նաև պրոֆ. Լ.Յ. Երզնկյանի կողմից մեկուսացված ագիդոֆիլային կաթնաթթվային բակտերիաների և 317/402 «Նարինե» շտամների [6] ֆագադիմացկունությունը, ֆագի առկայությունը, ինչպես նաև նրանց ֆագոլիզիսի զարգացումը 24 ժամվա ընթացքում: Ուսումնասիրել ենք նաև նրանց թուր արտադրման էներգիայի ազդեցությունը վերը նշված ֆագերի հատկությունների վրա: Պարզվել է, որ փորձարկված ագիդոֆիլային բակտերիաները 140-200°C թթվության դեպքում ֆագոլիզիս չեն առաջացրել (աղ. 2): Նույնիսկ ֆագերով վարակելուց հետո լիզիսի չեն ենթարկվում: Դա ըստ երևույթին պետք է բացատրել նախ 1. որ նրանք արտադրում են մեծ քանակությամբ թուր, որը ունի ֆագերի նկատմամբ ֆագոսպան հատկություն; 2. առաջացնում են մեծ քանակությամբ լորձ, որը ինչպես հայտնի է կաթնաթթվային ագիդոֆիլային բակտերիաների շուրջը առաջացնում է կապսուլ, որը թույլ չի տալիս ֆագերին ադսորբցվելու իր շուրջը և թափանցելու բջջի ներսը [4]:

Մեթիլեն կապույտի 0,1; 0,3; 0,5; 0,001 լուծույթների առկայության դեպքում կաթը մակարդվել է շտամին յուրահատուկ ժամանակահատվածում: Թերմոստատում 37° 1-7 օր պահելուց հետո, ինչպես նաև սառնարանում +4 +6° 1 ամիս և ավել պահելու դեպքում չի նկատվել ֆագոլիզիսի որևէ երևույթ: Դա

բացատրվում է նրանով, որ մեր կողմից թանգարանային կուլտուրաների վերացանքերը կատարվում է ասեպտիկ պայմաններում, պահպանելով միկրոբիոլոգիական բոլոր հրահանգները:

Աղյուսակ 2. *Lactobacillus acidophilus*-ի շտամների ֆագոկայունությունը և ֆագոլիզիսը

Շտամներ	Թթվությունը °Թ	Ֆագոկայունություն	Ֆագոլիզիս
317/402 «Նարինե» (ՍԱՅԿ - 9602)	160-200	+	-
4ar/8 (ՍԱՅԿ - 960)	140-160	+	-
ԷԻ-ԻՆՍԻՍ	140-160	+	-
ԷԻ ₂ -"	150-175	+	-
3e -"	150-165	+	-
5e -"	150-160	+	-
6e -"	145-155	+	-
7e -"	160-170	+	-
13-ԱՆԻ - (ՍԱՅԿ - 9006)	180-200	+	-
92-Արագած - (ՍԱՅԿ - 9605)	175-190	+	-
Լ - 2 - (ՍԱՅԿ - 9609)	180-200	+	-
ՍՊԸ արտադրանքներ <i>Lactobacillus acidophilus</i> 317/402 «Նարինե»			
հեղուկ	130-140	±	- + +
հեղուկ	150-160	±	- + +
հեղուկ	130-145	±	± ±
փոշի	-	±	± ±
փոշի	-	±	± ±
հաբեր	-	±	± ±
փոշի կապսուլներով	-	±	± ±
փոշի կապսուլներով	-	±	± ±

Ուսումնասիրել ենք նաև *L. acidophilus* 317/402 «Նարինե» (ՍԱՅԿ-9602) -ի ԱՊՅ երկրներում ինչպես նաև Հայաստանում սահմանափակ պատասխանատվությամբ ընկերությունների (ՍՊԸ) կողմից արտադրվող հեղուկ մակարոնները, փոշի-սրվակներով, փոշի-կապսուլներով (պատիճներ), հաբերի ֆագոկայունությունը, ֆագի առկայությունը, ֆագոլիզիսը և մի շարք կուլտուրալ հատկություններ: Որոշ պատրաստուկներ, երբ համեմատում ենք *L. acidophilus* 317/402 «Նարինե» (ՍԱՅԿ-9602) ավանդադրված շտամի հետ նկատում ենք, որ նրանք շատ հատկություններով տարբերվում են ելակետային շտամից: Նախ առաջացնում են քիչ լորձ, համարյա չեն ծորում, հաճախ 2-3 վերացանքսից հետո այն իսպառ վերանում է: Չեն դիմանում ֆենոլի 0,5-0,6% խտությամբ, P^H -8,3, չափանիշներ, որոնք ապահովում են նրանց բիոցենոզում բնակեցմանը, պահպանմանը: Շատ ցածր է հաբերում, փոշի-սրվակներում, կապսուլներում և հեղուկ մակարոններում, մթերքներում աջիդոֆիլային բակտերիաների քանակը: Եղել են դեպքեր, երբ օրինակ հաբերում, բոլորովին չեն եղել կենդանի աջիդոֆիլային կաթնաթթվային բակտերիաների բջիջներ:

Բացի վերը նշվածներից նրանք ֆագոկայուն չեն եղել: Ենթարկվել են մասնակի, երբեմն լրիվ լիզիսի [1]: Անհայտ ծագումով այդ «Նարինե»-ները սառնարանում կամ թերմոստատում պահպանության ժամանակ ջրիկանում են,

ենթարկվում են մասնակի լիզիսի, ֆագոլիզիսը ստուգելու համար նույնիսկ հարկ չի լինում պատրաստի ֆագի ֆիլտրատ ներարկել: Անհայտ է այդ «Նարինե»-ների ծագումնաբանությունը: Շատ հաճախ վերցնում են կաթնաթթվային ացիդոֆիլային բակտերիայի որևէ շտամ և պատրաստում են «Նարինե»: Սիայն այդ «Նարինե»-ների և նարնց որոշ պատրաստուկների կաթնաթթվային ացիդոֆիլային բակտերիաների գենետիկական ուսումնասիրությունները կտան նրանց իսկությունը:

Այսպիսով, տարբեր տեսակներին պատկանող կաթնաթթվային բակտերիաների ֆագոկայուն շտամներ ստանալու համար պետք է օգտագործել բնական սելեկցիան:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Банникова Л.А. Селекция молочнокислых бактерий и их применение в молочной промышленности. "Пищепромиздат". М. 255, 1975.
2. Габриелович И.М. Основы бактериофагии. Минск, "Высшая школа", 221, 1973.
3. Дебабов В.Г., Лившиц В.А. Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов, М., "Высшая школа", 204, 1988.
4. Ерзинкян Л.А. Биологические особенности некоторых рас молочнокислых бактерий. Ереван, Изд. АН Арм ССР, 235, 1971.
5. Зуева В.С., Пасьникова Л., Ильина Т.С. ЖМЭИ, М. 2. 36-39, 1984.
6. Каталог культур микроорганизмов. Ред. Э. Африкян, А. Хачатрян. Ереван, "Гитутюн" НАН РА, 260, 1996.
7. Мельникова Е.В. Автореф. канд. дисс. М., 21, 1971.
8. Мюнх Г.Д., Зауне Х., Штрайтер М. Микробиология продуктов животного происхождения (пер. с нем.) М., Агропромиздат, 592, 1985.
9. Пинегин Б.В., Мальцев В.Н., Коршунова Е.М. Дисбактериозы кишечника. М., "Медицина", 214, 1997.
10. Скородумова А.М. Практическое руководство по технической микробиологии молока и молочных продуктов. М., Пищепромиздат, 307, 1963.
11. Эйнштейн-Литвак Р.В., Вильшанская Ф.П. Бактериологическая диагностика дисбактериоза кишечника. Методические рекомендации, М., 28, 1977.
12. Яковлев Д.А. Автореф. канд. дисс. М., 35, 1962.
13. Bergey's manual of systematic bacteriology. 2, Baltimore, London, Los-Angeles, Sydney (Bacteriophage), 1986.

Поступила 13.X.2004