

ՀՏԴ 618.1: 579.2

Կրծքի կաթից կաթնաթթվային բակտերիաների անջատումը և ուսումնասիրությունը

Լ.Վ. Դանիելյան

ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ
0056, Երևան, Գյուրջյան փ., 14

Բանալի բառեր. կրծքի կաթ, լակտոբացիլներ, լակտոկոկեր

Կրծքի կաթը, իր հարուստ սննդային արժեքների, կենսաակտիվ բաղադրիչների՝ վիտամինների, միկրոէլեմենտների, ֆերմենտների, իմուն և աճի գործոնների, ինչպես նաև նրանում պարունակվող պրոբիոտիկ բակտերիաների շնորհիվ, բարենպաստ ազդեցություն է ունենում ինչպես նորածնի աղեստամոքսային համակարգի, այնպես էլ ամբողջ օրգանիզմի վրա [2, 6-8]: Կրծքի կաթում առկա պրոբիոտիկ բակտերիաները կանխարգելում են ախտածին մանրէների աճը նորածնի աղեստամոքսային համակարգում՝ իջեցնելով ինֆեկցիոն հիվանդություններով հիվանդանալու հավանականությունը [1-5, 11]: Նորածնի աղիքային միկրոբիոտայի ձևավորումը հիմք է հանդիսանում նորածինների աղիքային պատնեշի ամրապնդմանը՝ լորձաթաղանթների արտանետումների արտադրության և աղիքային թափանցելիության նվազմանը, օրգանիզմի նյութափոխանակային և իմունաբանական ծրագրմանը, հետևաբար՝ նպաստում է կարճաժամկետ և երկարաժամկետ առողջական վիճակի ձևավորմանը և բարելավմանը [8-10]: Ստացված գիտելիքները կարող են հիմք հանդիսանալ հետազայում մանկական սննդի նոր բանաձևեր մշակելու համար, որոնք ավելի լավ կարող են ընդօրինակել կրծքի կաթի բնօրինակը և նպաստել առողջ աղիքային միկրոբիոտայի ձևավորմանը:

Տվյալ աշխատանքի նպատակն է հայաստանաբնակ կլինիկոքեն առողջ կանանց կրծքի կաթից կաթնաթթվային բակտերիաների (ԿԹԲ) անջատումը, ուսումնասիրությունը, նախնական նույնականացումը և համեմատական բնութագիրը:

Նյութը և մեթոդները

Հետազոտության նյութը հայաստանաբնակ 22-28 տարեկան կլինիկորեն առողջ ծննդկանների կաթից մեր կողմից անջատված լակտոբացիլների (*Lactobacilli*) և լակտոկոկերի (*Lactococci*) շտամներն են: Աշխատանքում օգտագործվել են ստերիլ տարաներ, մանրէագերծ թանգիֆ, LAPTg [12] (գլյուկոզ 10, պեպտոն-15, տրիպտոն-10, շաքարասկային էքստրակտ-10, տվին 80 - 1 մլ) ազար և արգանակ, MRS (Himedia, India) ազար և արգանակ, Nutrient broth standard 1 (Serva, Berlin), յուղագերծ կաթ, Գրամի ներկման հավաքածու (Gram Staining Set, Ghatran, IIR), օքսիդազային սկավառակներ (Himedia, India) և նյութերը՝ քլորհեքսիդին գլյուկոնատի 0.1% լուծույթ, 0.1 % մեթիլեն կապույտ, ածխաջրերի հավաքածու (CIBA — GEIG), ջրածնի պերօքսիդ (H_2O_2), L-արգինին, NaCl, HCl, NaOH, K_2HPO_4 :

Կրծքի կաթի նմուշները վերցվել են 22-28 տարեկան կլինիկորեն առողջ ծննդկաններից՝ պահպանելով ասեպտիկայի բոլոր կանոնները՝ նախօրոք օձառով և ջրով լվացվել են ձեռքերը, հետո կրծքի արեոլը և պտուկը, սրբվել մանրէագերծ թանգիֆով և վերջում քլորհեքսիդին գլյուկոնատի 0,1%-անոց լուծույթով: Մանրէագերծ թանգիֆով չորացնելուց հետո մոտ 0,5 - 1 մլ կաթը թափվել է՝ մաշկից անցած ադտոտվածությունից խուսափելու համար: Կաթը 2-3 մլ ձեռքով արտամզվել է մանրէագերծ փորձանոթի մեջ, տեղադրվել սառույցով տարայի մեջ, 1 ժամվա ընթացքում հասցվել լաբորատորիա: Վերցված կաթի նմուշները նոսրացումներով ցանվել են յուղագերծ կովի կաթում, սելեկտիվ ազարային LAPTg և MRS միջավայրերում, այնուհետև մայրական կաթի նմուշի հետ (որպես ստուգիչ) ինկուբացվել 1 – 3 օր 37°C – ում:

Կաթնաթթվային բակտերիաների մաքուր կուլտուրաներ ստանալու նպատակով վերջին նոսրացումներից կատարվել են ցանքսեր սելեկտիվ միջավայրերի վրա: Աճած գաղութներ, ըստ իրենց մորֆոլոգիական հատկանիշների, մաքրվել են, և կրկին ստուգվել է նրանց կողմից կաթը ֆերմենտացնելու ունակությունը: Անջատված լակտոբակտերիաները ներկվել են ըստ Գրամի, ուսումնասիրվել լուսային մանրադիտակի տակ: Ուսումնասիրվել են նաև անջատված շտամների կատալազային, օքսիդազային ակտիվությունը, արգինինից ամոնիակի առաջացումը, կայունությունը ջերմաստիճանի 10-50 °C տիրույթներում նաև NaCl-ի 4,0-6,0 և PH-ի 2-9,5-ի նկատմամբ: Ածխաջրերի յուրացումը ստուգվել է ըստ Բերջիի բակտերիաների որոշչի՝ 18 տարբեր շաքարների կիրառմամբ:

Փորձերը կատարվել են 3-5 կրկնությամբ, ստացված տվյալները ենթարկվել են հավաստիության գնահատման վիճակագրական մշակման՝ ըստ Ստյուդենտի թեստի, և օգտագործվել է R Project for Statistical Computing version R 3.1.1 ծրագիրը: Աշխատանքում ստացված տվյալները համարվում են հավաստի $p < 0,05$, եթե հետազայում այլ արժեքներ չեն դիտարկվել:

Արդյունքները և քննարկումը

Բոլոր միջավայրերում, այդ թվում նաև կովի կաթում, առկա է մանրէների հավասար աճ մինչև 10^{-4} նոսրացում, ինչը վկայում է մայրական կաթում $10^4 - 10^5$ ԳԱՄ/մլ կաթնաթթվային բակտերիաների գոյության մասին (աղ. 1.):

Աղյուսակ 1

Մայրական կաթի նոսրացումները

Միջավայր	Նոսրացումներ			
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
Կովի կաթ	+++	+++	+++	+++
LAPTg	++	++	++	++
MRS	++	++	+++	+++
Գաղութների քանակը	4000	300-500	30-50	3-5
Ընդհանուր ԳԱՄ/մլ	$4,0 (\pm 0,5) \times 10^5$			

Իսկ MRS և LAPTg ագարի վրա արված ցանքերի արդյունքում առաջացած գաղութների ուսումնասիրությունը ցույց տվեց մորֆոլոգիապես իրարից տարբերվող գաղութներ. ստուգվել է նաև նրանց՝ կովի կաթը մակարդելու հատկությունը (աղ. 2.): Մեկուսացված շտամների մոտ ստուգվել է Գրամով ներկվելու ունակությունը, կատալազային և օքսիդազային ակտիվությունները, արգինինից ամոնիակի առաջացումը (աղ. 3.): Գրամդրական, կատալազա և օքսիդազա բացասական շտամներն առանձնացվել են հետագա ուսումնասիրությունների համար:

Աղյուսակ 2

Կրծքի կաթից անջատված կաթնաթթվային բակտերիաների և գաղութների մորֆոլոգիկ հատկանիշները և կաթի ֆերմենտացիան

ԳԹԲ շտամ	Գաղութների մորֆոլոգիան		Բջջիների մորֆոլոգիան		Կաթի ֆերմենտացիան
	Տեսքը	Չափսերը, մմ	Տեսքը	Չափսերը, մկմ	
LH45	Սպիտակ, փոքր	1,0-1,2	Կոկեր, երկար շղթաներ	0,7 – 0,9	++
LH46	Սպիտակ, փոքր	1,0-1,3	Կոկեր, կարճ շղթաներ	0,7 -2,0	++
LH 47	Կաթնա- գույն, միջին	2,0-2,5	Ցուպիկներ, կարճ շղթաներ	0,5 x 2,5	+++
LH 48	Կաթնա- գույն, միջին	2,0-2,5	Ցուպիկներ	1,0 x 3,0	+++
LH 49	Սպիտակ, միջին	1,0-1,2	Կոկեր, շղթաներով	0,5 -1,5	+++
LH 51	Սպիտակ, միջին	1,0-1,5	Կոկեր, դիպլոկոկեր	1,0 – 1,2	++
LH 51	Կաթնա- գույն, փոքր	1,0 -1,5	Ցուպիկներ, երկար, բարակ	1,5 x 2,0	+++
LH 52	Կաթնա- գույն, փոքր	1,2-1,5	Ցուպիկներ, հաստ, կարճ	0,5 x 1,0	+++
LH 53	Սպիտակ, միջին	1,5-2,0	Կոկեր, կարճ շղթաներ	0,7 – 3,0	++
LH 54	Սպիտակ, փոքր	1,0-1,2	Դիպլոկոկեր, կոկերի երկար շղթաներ	0,5 -1,5	++

+ թույլ, ++ միջին, +++ լավ

Ինչպես երևում է աղյուսակ 2-ից, ֆերմենտացված կաթերից ազարային միջավայրի վրա արված ցանքերի արդյունքում առաջացած գաղութները տարբերվում են տեսքով, գույնով և չափսերով: Գաղութները կարելի է բաժանել 4 հիմնական խմբերի՝ սպիտակ, փոքր՝ 1,0-1,3 մմ, կաթնագույն, միջին 2,0-2,5 մմ և կաթնագույն, փոքր 1,0-1,5 մմ և սպիտակ, միջին 1,5-2,0 մմ տրամագծերով: Մանրադիտակային ուսումնասիրությունը ցույց տվեց 4 ցուպիկային և 6 կոկային շտամներ:

Ինչպես երևում է աղյուսակից, անջատված լակտոբացիլների և

լակտոկոկերի մոնոկուլտուրայով ընդունակ են ֆերմենտացնելու կաթը, սակայն կաթի մակարդման արագությամբ և մակարդուկների թանձրությամբ լակտոկոկերը զիջում են լակտոբացիլներին:

Աղյուսակ 3

ԿթԲ-ների օքսիդազային, կատալազային ակտիվությունները, արգինինից NH₃ առաջացման ուսումնասիրությունը և ներկումն ըստ Գրամի

ԿթԲ շտամ	Կատալազային ակտիվություն	Օքսիդազային ակտիվություն	Արգինինից NH ₃ առաջացումը	Ներկումն ըստ Գրամի
LH45	-	-	-	+
LH46	-	-	-	+
LH47	-	-	+	+
LH48	-	-	+	+
LH49	-	-	-	+
LH50	-	-	+	+
LH51	-	-	+	+
LH52	-	-	+	+
LH53	-	-	+	+
LH54	-	-	-	+

+ աճ կա, - աճ չկա

Ինչպես երևում է աղյուսակ 3-ից, բոլոր լակտոբացիլները կատալազա և օքսիդազա բացասական են, գրամդրական են, իսկ արգինինից ամոնիակ առաջացնում են վեց շտամ:

Մայրական կաթից անջատված լակտոբացիլների ֆիզիոլոգիական և կուլտուրալ հատկությունները ներկայացված են աղ. 4-ում:

Փորձի արդյունքներից երևում է, որ 10 °C-ում աճը բացակայում է կաթնաթթվային բակտերիաների միայն չորս շտամներում, 45°C և 50°C ջերմաստիճաններում աճում են բոլոր շտամները, բացի 2-ից, pH 2 – 9,5-ի տիրույթում կայուն չեն փորձարկված կաթնաթթվային բակտերիաների շտամներից միայն հինգը, 0,1% մեթիլեն կապույտ պարունակող կաթում աճում է միայն երկու շտամ, իսկ 6,5% NaCl-ի հանդեպ զգայուն է երկու շտամ:

Աղյուսակ 4

Հակատրագիչների, լակտոկոկերի աճը և կայունությունը միջավայրի տարբեր պայմաններում

ԿԹԲ	Աճը տարբեր C°			Աճը NaCl-ում %		Աճը pH-ում		0.1%-ոց մեթիլեն կապույ- տով կաթում
	10	45	50	4.0	6.5	2	9.5	
LH45	+	+	+	+	+	+	-	-
LH46	+	+	+	+	+	+	+	-
LH47	-	+	+	+	+	+	-	+
LH48	+	+	-	+	+	+	+	-
LH49	+	+	-	+	+	+	-	+
LH50	-	+	+	+	+	+	+	-
LH51	+	+	+	+	-	+	+	-
LH52	-	-	-	+	-	+	+	-
LH53	+	+	+	+	+	+	-	-
LH54	+	+	+	+	-	-	-	-

+ աճ կա, - աճ չկա

Աղյուսակ 5-ում ներկայացված է անջատված շտամների կողմից 18 տարբեր ածխաջրերի յուրացումը, որտեղից երևում է, որ այդ կուլտուրաները տարբերվում են միմյանցից շաքարների յուրացման պրոֆիլով:

Աղյուսակ 5

Շտամների կողմից ածխաջրերի յուրացման պրոֆիլը

ԳԹԿ	Բաղվում առ	Գլյուկոզ	Բասիկոլաֆ	Բասիկոլոմբ	Գլյուկոզ	Բասիկոլ	Բասիկոլ	Մաննիտ	Բասիկոլաֆ	Բասիկոլաֆ	Բասիկոլաֆ	Բասիկոլաֆ	Բասիկոլաֆ	Բասիկոլաֆ	Բասիկոլաֆ	Բասիկոլաֆ	Բասիկոլաֆ	Բասիկոլաֆ
LH 45	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-
LH 46	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
LH 47	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-
LH 48	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
LH 49	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-
LH 50	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
LH 51	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
LH 52	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
LH 53	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LH 54	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-

+ աճ կա, - աճ չկա

Ներկայացված տվյալների վերլուծության հիման վրա կատարվել է ցուպիկային և կոկային շտամների նույնականացում՝ համաձայն Բերջիի բակտերիաների որոշչի: Ըստ որի՝ անջատված կոկային շտամներից երեքը՝ LH49, LH53, LH54, պատկանում են *Lactococcus lactis*, LH45, LH46 և LH50՝ *Streptococcus thermophilus* տեսակներին: Ցուպիկային շտամներից երեքը՝ LH48, LH51, LH52, պատկանում են *Lactobacillus casei*, իսկ LH47-ը՝ *Lactobacillus fermentum* տեսակներին (աղ. 6.):

Աղյուսակ 6

Կրծքի կաթից անջատված կաթնաթթվային բակտերիաների տեսակային պատկանելությունն ըստ *Բերջիի որոշիչի*

ԿԹԲ-ների տեսակները	Շտամները	Քանակը
<i>Lactobacillus casei</i>	LH48, LH51, LH52	3
<i>Lactobacillus fermentum</i>	LH47	1
<i>Lactococcus. lactis</i>	LH49, LH53, LH54	3
<i>Streptococcus thermophilus</i>	LH45, LH46, LH50	3

Այսպիսով, ընդհանրացնելով ստացված արդյունքները՝ կարելի է ասել, որ կրծքի կաթը պարունակում է տարատեսակ լակտոբացիլներ և լակտոկոկեր, որոնց հարաբերությունը, ըստ մեր տվյալների, կազմում է 2:3: Հայաստանաբնակ կանանց կրծքի կաթում ԿԹԲ-ների քանակը տատանվում է $2,0 \times 10^4 - 1,0 \times 10^5$ ԳԱՄ/մլ-ի սահմաններում: Մեկուսացված ԿԹԲ-երը կարող են հանդես գալ որպես թեկնածու պրոբիոտիկներ՝ նորածինների աղիների կենսագործունեության բարելավման, օգտակար միկրոֆլորայի ձևավորման և պահպանման նպատակով:

Ընդունված է՝ 02.07.21

Выделение и исследование молочнокислых бактерий из грудного молока

Л.В. Даниелян

Грудное молоко с его богатой питательной ценностью, биоактивными компонентами, витаминами, микроэлементами, ферментами, факторами иммунного роста, а также недавно обнаруженными пробиотическими бактериями благотворно влияет как на желудочно-кишечный тракт ребенка, так и на организм в целом.

Целью данного исследования является выделение, изучение, предварительная идентификация и сравнение молочнокислых бактерий у клинически здоровых женщин, проживающих в Армении.

Образцы грудного молока были взяты у клинически здоровых рожениц 22-28 лет с соблюдением всех правил асептики. Образцы молока

разбавляли обезжиренным коровьим молоком в селективной агаровой среде LAPTg MRS, затем инкубировали с образцом грудного молока в течение 1-3 дней при 37 ° С.

Для получения чистых культур молочнокислых бактерий посев производили на селективные среды из последних разведений. Выросшие колонии очищали в соответствии с их морфологическими особенностями и повторно проверяли на способность ферментировать молоко. Выделенные лактобациллы окрашивали по Граму и исследовали под световым микроскопом. Изучены каталазная, оксидазная активность выделенных штаммов, образование аммиака из аргинина, устойчивость к разным концентрациям NaCl и к разным значениям pH в температурном диапазоне 10° С – 50° С. Была проверена ассимиляция 18 различных сахаров изолированными штаммами, а также проведена предварительная идентификация в соответствии с определителем бактерий Берджи.

На основании полученных результатов, можно сказать, что грудное молоко содержит разные виды лактобацилл и лактококков, соотношение которых, по нашим данным, составляет 2 : 3. Количество лактобактерий в грудном молоке армянских женщин колеблется от $2,0 \times 10^4$ – $1,0 \times 10^5$ КОЕ / мл. Изолированные молочнокислые бактерии могут быть использованы в качестве возможных кандидатов в пробиотики, с целью улучшения функции кишечника новорожденных, для развития и поддержания полезной кишечной микрофлоры.

Isolation and Investigation of Lactic Acid Bacteria from Breast Milk

L.V. Danielyan

Breast milk, with its rich nutritional value, bioactive components, vitamins, trace elements, enzymes, immune growth factors, as well as newly discovered probiotic bacteria, has a beneficial effect both on the baby's gastrointestinal tract and on the body as a whole.

The purpose of this study is the isolation, study, preliminary identification and comparison of lactic acid bacteria in clinically healthy women living in Armenia.

Breast milk samples were taken from clinically healthy women aged 22-28 years in compliance with all the rules of asepsis. Milk samples were diluted with skimmed cow's milk in LAPTg MRS selective agar medium, then incubated with a breast milk sample for 1-3 days at 37 °C.

To obtain pure cultures of lactic acid bacteria, inoculation was performed on selective media from the last dilutions. The grown colonies were purified according to their morphological characteristics and retested for their ability to ferment milk. Isolated lactobacilli were stained according to Gram and

examined under a light microscope. There were studied the catalase and oxidase activity of the isolated strains, the formation of ammonia from arginine, resistance to different NaCl concentrations and to different pH values in the temperature range of 10 ° C -50 ° C. Assimilation of 18 different sugars by isolated strains was tested, and preliminary identification was also carried out according to Bergey's determinant of bacteria.

Based on the results obtained, we can say that breast milk contains different types of lactobacilli and lactococci, the ratio of which, according to our data, is 2: 3. The amount of LAB in the breast milk of Armenian women ranges from 2.0×10^4 - 1.0×10^5 CFU / ml. Isolated lactic acid bacteria can be used as potential probiotic candidates to improve gut function in newborns, to develop and maintain beneficial intestinal microflora.

Գրականություն

1. Albesharat R., Ehrmann M., Korakli M., Yazaji S. and Vogel R.F., Phenotypic and genotypic analyses of lactic acid bacteria in local fermented food, breast milk and faeces of mothers and their babies. Systematic and Applied Microbiology, 2011, vol. 34, p. 148-155.
2. American Academy of Pediatrics (AAP) Breastfeeding and the use of human milk. Pediatrics. 2012, vol. 129, p.827-841.
3. Bhatt V. D., Vaidya Y.H., Kunjadia P.D., Kunjadia A.P. Isolation and characterization of probiotic bacteria from human milk. Inter. Journal of pharmaceutical science and health care, 2012, Issue 2, vol. 3.
4. Beasley S.S., Saris P.E.J. Nisin-producing *Lactococcus lactis* strains isolated from human milk. Applied and Environment Microbiology, 2004, 70: 5051-3.
5. Cabrera-Rubio R., Collado M.C., Laitinen K., Salminen S., Isolauri E. and Mira A., The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. American Journal of Clinical Nutrition, 2012, vol. 96/3 p.544-551.
6. Fernández L., Langa S., Martín V., Maldonado A., Jiménez E., Martín R., Rodríguez J.M. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. Pharmacol. Res., 2013, 69 (1), 1-10.
7. Farhana S.D., Khondoker M.H., Azim M.A. and Md. Moinul Hoque, Isolation, Characterization and Determination of Antimicrobial Properties of Lactic Acid Bacteria from Human Milk. 2013, vol. 6/2, p.11-116.
8. Jeurink P.M., Bergenhenegouwen J., Jimenez E., Knippels L.M.J., Fernandez L., Garssen J., Knol J., Rodriguez J.M. and Martin R. Human milk: a source of more life than we imagine. Wageningen Academic Publishers. Beneficial Microbes 2013, 4 (1): 17-30.
9. Martin R., Langa S., Reviriego C., Jimenez E., Marin L.M., Xaus J., Fernandez L., Rodriguez J.M. Human milk is a source of lactic acid bacteria for infant gut. The Journal of Pediatrics, 2003, 143, 754-758.
10. Martín, R., Langa, S., Reviriego, C., Jimenez, E., Marin, L.M., Olivares, M., Boza, J., Jimenez, J., Fernandez, L., Xaus, J. & Rodriguez, J.M. The commensal microflora of human milk: New perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. Trends in Food Science&Technology, 2004, 15, 121-127.
11. Olivares M., Díaz-Ropero M.P., Martín R., Rodríguez J.M., Xaus J. Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. Journal of Applied Microbiology, 2006, 101: 72-9.
12. Vaningelgem F., Zamfir M., Adriany T., De Vuyst L. J. Appl. Microbiol., 2004,v. 97. p. 1257-1273.