

УДК 618.1: 579.2

Հեշտոցային լակտոկոկերի անջատումը և բնութագրումը

Գ.Գ. Գրիգորյան, Հ.Գ. Հովհաննիսյան

ՀՀ ԳԱԱ “Հայկենսատեխնոլոգիա” ԳԱԿ
0056, Երևան, Գյուրջյան փ., 14

Բանալի բառեր. լակտոկոկեր, աճի արագություն, հակամանրէային
ակտիվություն, վազինոզ

Հեշտոցային լակտոբակտերիաները մեծ դեր ունեն կնոջ առողջության պահպանման համար: Կնոջ հեշտոցը ներկայացված է բարդ միկրոբային համակարգով՝ կազմված լակտոբակտերիաներից և այլ բակտերիաներից, ինչպիսիք են *Staphylococcus*, *Ureaplasma*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Gardnerella*, *Bacterioides*, *Mycoplasma*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Veilloella*, *Bifidobacterium* և *Candida*, սակայն համեմատաբար քիչ քանակությամբ [5]: Լակտոբակտերիաների գործունեության շնորհիվ առողջ կնոջ մոտ հեշտոցային pH-ը պահպանվում է 3,5-4,5 սահմաններում, որը խոչընդոտում է սեռավարակների թափանցմանը [2, 6, 9, 10, 13]: Տարբեր գործոնների ազդեցության տակ՝ սննդակարգ, հիգիենիկ պայմաններ, սթրեսներ, ինֆեկցիաներ, իմունիտետի անկում և այլն, հեշտոցի մանրէային բաղանսը խախտվում է, որն արտահայտվում է լակտոբակտերիաների քանակի նվազմամբ և ախտածին միկրոօրգանիզմների քանակի, ինչպես նաև pH-ի բարձրացմամբ:

Վազինոզների բուժման էֆեկտիվությունը բարձրացնելու և սեռավարակների կրկնությունը կանխելու համար հակաբիոտիկային թերապիայից հետո հեշտոցն անհրաժեշտ է վերագաղութացնել լակտոբակտերիաներով: Լակտոբակտերիաների գաղութացման արդյունավետությունը կախված է նրանց ադապտիվ (բազմացման արագություն, էպիթելիալ բջիջների վրա ադիզիա, սթրեսների հանդեպ կայունություն) և պրոբիոտիկ (միջմանրէային փոխազդեցություն, հակամանրէային միացությունների՝ կաթնաթթվի, ջրածնի պերօքսիդի, բակտերիոցինների սինթեզ) հատկություններից, ինչպես նաև իմունամոդուլյացիոն ունակություններից [3, 4, 7, 8]:

Կախված աշխարհագրական դիրքից, բնակլիմայական պայմաններից, կենսակերպից՝ տարբեր երկրների կանանց հեշտոցային միկրոֆլորան ներկայացված է տարբեր տեսակների պատկանող լակտոբակտերիաներով: Հայաստանաբնակ կանանց հեշտոցային միկրոֆլորան դեռևս լավ ուսումնասիրված չէ:

Տվյալ աշխատանքի խնդիրն է հանդիսացել հայաստանաբնակ կանանց հեշտոցից լակտոբակտերիաների անջատումը, ուսումնասիրումը և նախնական նույնականացումը:

Նյութը և մեթոդները

Հետազոտության նյութ են հանդիսացել հայաստանաբնակ վերարտադրողական տարիքի կանանցից մեր կողմից անջատված լակտոկոկերի *Lactococcus sp.* GH12, GH13 և GH14 շտամները: Որպես թեստ-կուլտուրա օգտագործվել է *Escherichia coli* շտամը:

Աշխատանքում օգտագործվել են MRS (Himedia), LAPTg [1] ագարային և արգանակային միջավայրերը, յուղագերծ կաթ, Triptose agar (Ferak Berlin), լիարժեք արգանակ՝ Nutrient broth standard 1 (Serva):

Հեշտոցային քսուքները վերցվել են ստերիլ բամբակյա տամպոնով հեշտոցի միջին մասից պտտած և շարժումով, այնուհետև կատարվել է ցանքս LAPTg ագարի վրա՝ հեշտոցի միկրոֆլորայի բազմազանության ուսումնասիրության համար, և ստերիլ յուղագերծ կաթի մեջ՝ ստուգելու կաթնաթթու սինթեզող բակտերիաների առկայությունը, և դրվել են 37°C տակ: Ֆերմենտացված կաթերի նմուշներից կատարվել է ցանքս MRS միջավայրի վրա: Ըստ առաջացած գաղութների մորֆոլոգիայի ստացված կուլտուրաները մաքրվել են և ստուգվել նրանց կողմից կաթը ֆերմենտացնելու ունակությունը:

Անջատված լակտոբակտերիաները ներկվել են ըստ Գրամի և ուսումնասիրվել լուսային մանրադիտակի տակ:

Կուլտուրաների աճի արագությունը որոշվել է LAPTg և MRS արգանակներում ճոճանակով ջրային բաղնիքում 37°C տակ օպտիկական խտությունների չափման միջոցով 590 նմ ալիքի երկարության տակ:

Անջատված կաթնաթթվային կուլտուրաների հակամանրէային ակտիվությունը որոշելու համար գիշերային կուլտուրաները 1:20 հարաբերությամբ ինօկուլացվել են թարմ MRS արգանակում, ինկուբացվել են 37°C տակ 24 ժ, որից հետո բակտերիաները նստեցվել են 3000 g ցենտրիֆուգման միջոցով և վերնստվածքային հեղուկների հակաբակտերիալ ակտիվությունները որոշվել են ագարում դիֆուզիայի և կաթիլային եղանակներով թեստ-կուլտուրայի վրա: Բակտե-

րիոցինները օրգանական թթուներից տարանջատելու համար վեր-
նաստվածքային հեղուկների pH-ը հասցվել է 6,0:

Արդյունքները և դրանց քննարկումը

Հայաստանաբնակ 30-40 տարեկան կանանց հեշտոցից վերցված չորս քսուքների կաթի մեջ ինոկույացիայի ուսումնասիրության ար-
դյունքում պարզվեց, որ նրանցից երեքը ֆերմենտացրել են կաթը, ինչը
վկայում է նրանցում կաթնաթթվային կուլտուրաների առկայության
մասին: Իսկ MRS ագարի վրա նույն քսուքներից արված ցանքերի ար-
դյունքում առաջացած գաղութների և նրանց բջիջների մորֆոլոգիա-
ների համեմատական ուսումնասիրությունը հնարավորություն տվեց
հայտնաբերել նշված կուլտուրաների տարբերությունները (աղ. 1):

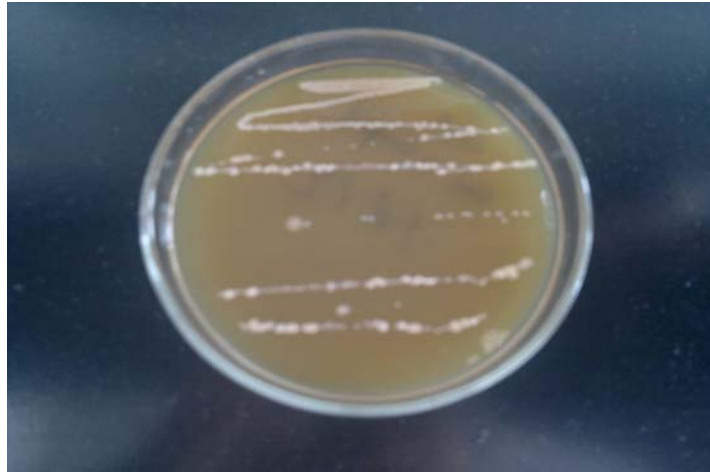
Աղյուսակ 1

*Հեշտոցից անջատված կաթնաթթվային բակտերիաների գաղութների և
բջիջների մորֆոլոգիական առանձնահատկությունները*

Կուլտու- րայի անվա- նումը	Գաղութների մորֆոլոգիան		Բջիջների մորֆոլոգիան		Գրամ
	տեսքը	չափ- սերը	տեսքը	չափսերը	
GH 12	սպիտակ	1-2մմ	կոկ, կարճ շղթաներ	1,0-1,5մկմ	+
GH 15	կաթնա- գույն	3 մմ	ցուպիկ	1,0 x 3,0 մկմ	+
GH 13	սպիտակ	1-2 մմ	կոկ	1,0-1,5 մկմ	+
GH 16	կաթնա- գույն	3-4 մմ	ցուպիկ	1,0 x 3,0 մկմ	-
GH 14	սպիտակ	1 մմ	կոկ	0,5-1,0 մկմ	+

Ինչպես երևում է աղյուսակ 1-ից, ֆերմենտացված կաթերից
ագարային միջավայրի վրա արված ցանքերից առաջացած գաղութ-
ները գունավորումով և չափսերով բաժանվում են 2 հիմնական խմբե-
րի՝ սպիտակ, 1-2 մմ, և կաթնագույն, 3 մմ տրամագծերով: Մանրադի-
տակային ուսումնասիրությունները ցույց տվեցին, որ սպիտակ, փոքր
չափսի գաղութները ձևավորվել են կոկային շտամներով, իսկ կաթ-
նագույն մեծ գաղութները՝ ցուպիկային շտամներով:

Որոշ կանանց հեշտոցը գաղութացված էր մեկից ավել կաթնա-
թթվային և այլ բակտերիաներով (նկ. 1):



Նկար 1. Հեշտոցից վերցված քսուկից ազարի վրա արված անմիջական ցանքսի արդյունքում առաջացած գաղութների մորֆոլոգիան

Ընդհանուր առմամբ անջատվել են երեք կոկային և մեկ ցուպիկային գրամ- դրական կուլտուրաներ, ինչպես նաև մեկ գրամբացասական ցուպիկային կուլտուրա:

Կոկային շտամների կուլտուրալ հատկանիշները և կաթը ֆերմենտացնելու ունակությունները ներկայացված են աղյուսակ 2-ում:

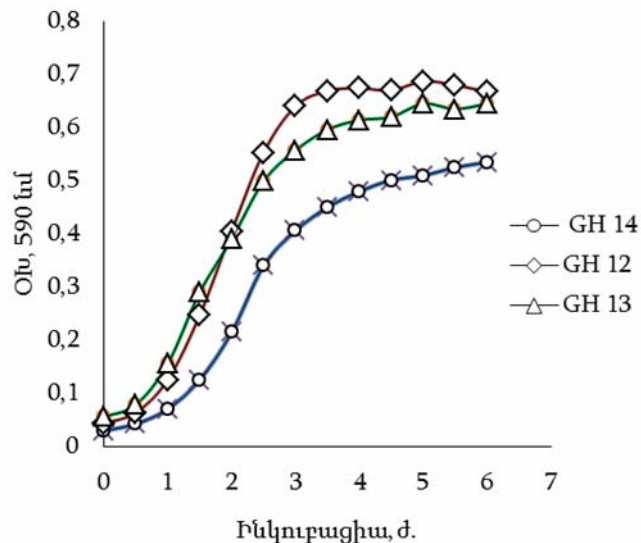
Աղյուսակ 2

Հեշտոցային կոկերի կուլտուրալ հատկությունները

Շտամի անվանումը	Աճը MRS-ում 37°C- ի տակ		Կաթի ֆերմենտացումը	Աճը մինիմալ միջավայրում
	աէրոբ	անաէրոբ		
GH 12	+++	+++	+++	-
GH 13	+++	+++	++	-
GH 14	++	++	++	-

Ներկայացված տվյալները վկայում են այն մասին, որ անջատված կոկային շտամները նույն արդյունավետությամբ աճում են աէրոբ և անաէրոբ պայմաններում և մոնոկուլտուրայով ֆերմենտացնում են կաթը: Մինիմալ միջավայրի վրա աճի բացակայությունը հաստատում է այն փաստը, որ կաթնաթթվային կոկերը պոլիատոքսոտրոֆ են և կարիք ունեն մեկ տասնյակից ավել տարբեր աճի գործոնների՝ նուկլեինաթթուների, ամինաթթուների և վիտամինների [12]:

Ուսումնասիրվել է կոկային կուլտուրաների աճի օրինաչափությունները MRS միջավայրում ինտենսիվ աերացիայի պայմաններում (նկ. 2):



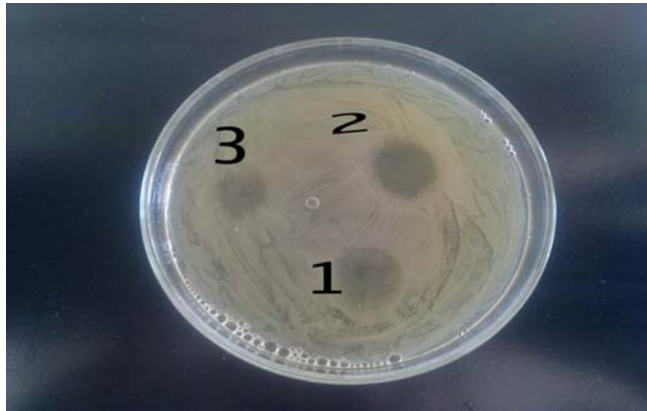
Նկար 2. Լակտոկոկային կուլտուրաների աճի դինամիկան MRS միջավայրում 37°C -ի տակ ինտենսիվ աերացիայի պայմաններում: ՕԽ-օպտիկական խտություն

Ներկայացված կորերից երևում է, որ շատ կարճ՝ 20-30 րոպե տևող lag փուլից հետո սկսվում է կուլտուրաների ինտենսիվ աճը՝ log փուլը, որը GH 12 և GH 13-ի մոտ տևում է 3 ժամ, այն դեպքում, երբ GH 14 կուլտուրայի մոտ նրա տևողությունը հասնում է 4-5 ժամի, որից հետո տեղի է ունենում անցում ստացիոնար փուլին: Կուլտուրաները տարբերվում են նաև մաքսիմալ կենսազանգվածի կուտակման մակարդակով (ՕԽ):

Որոշվել է լակտոկոկերի կուլտուրաների սուպերնատանտների հակամիկրոբային ակտիվությունը կաթիլային եղանակով (նկ. 3):

Նկար 3-ից հստակ երևում է, որ լակտոկոկերի արգանակային կուլտուրաների բջջազուրկ հեղուկները (0,3 մլ) լիովին ճնշում են թեստ-շտամների աճը՝ առաջացնելով 15-20 մմ ճնշման գոտիներ: GH 14 շտամը հակաբակտերիալ ակտիվությամբ նույնպես զիջում է մյուս լակտոկոկային շտամներին:

Լակտոբակտերիաները օժտված են տարբեր հակաբակտերիալ միացությունների՝ բակտերիոցինների սինթեզի ունակությամբ, որոնք



Նկ. 3. Թեստ-շտամի աճի ճնշումը լակտոկոկային կուլտուրաների սուպերնատանտների կողմից (1-GH 12, 2-GH 13, 3-GH 14)

մեծամասամբ իրենցից ներկայացնում են կարճ՝ 20-40 ամինաթթու պարունակող պեպտիդներ [4]: Հակաբակտերիալ ակտիվության ստուգումից առաջ pH-ի բարձրացումը մինչև 6,0 չեզոքացնում է օրգանական թթուների ազդեցությունը՝ չխաթարելով բակտերիոցինների ակտիվությունը: Նեյտրալիզացված բակտերիալ կուլտուրաների սուպերնատանտների ակտիվությունը վկայում է հակաբակտերիալ միացությունների առկայությունը նրանցում:

Բազմացման բարձր արագությունը շատ կարևոր է հեշտոցում լակտոբակտերիաների քանակի և pH-ի արագ վերականգնման համար, որոնք խախտվում են մենստրուալ ցիկլից և սեռական հարաբերություններից հետո: Մենստրուալ հեղուկը հարուստ միջավայր է հեշտոցում առկա տարբեր միկրոօրգանիզմների բազմացման համար, որոնք բարձրացնում են հեշտոցի pH-ը և խախտում միկրոֆլորայի հաշվեկշիռը: Իր հերթին սերմնահեղուկը ունենալով բուֆերային հիմնային հատկություն (pH-8,0), բարձրացնում է հեշտոցի pH-ը մինչև 7,0, ինչը նույնպես նպաստում է պաթոգեն և պայմանական պաթոգեն միկրոօրգանիզմների բազմացմանը: Լակտոբակտերիաները արագ բազմանալով՝ առաջացնում են մեծ քանակի կաթնաթթու, որը ճնշում է պաթոգեն միկրոօրգանիզմների աճը և բերում հեշտոցում թթվային pH-ի արագ վերականգնմանը [6]:

Այսպիսով, կարելի է արձանագրել, որ երեք տարբեր աղբյուրներից անջատված հեշտոցային լակտոկոկերից երկուսը օժտված են բազմացման բարձր արագությամբ և հակաբակտերիալ ակտիվությամբ: Համաձայն գրականության տվյալների [5] եվրոպաբնակ և ամերիկաբնակ կանանց հեշտոցային միկրոֆլորայում լակտոկոկեր քիչ են

հանդիպում, սակայն մեր կողմից տարված ուսումնասիրությունները ցույց են տվել [8], որ հայաստանաբնակ կանանց հեշտոցում կոկային կուլտուրաներ բավականին հաճախ են հանդիպում: Նկատված տարբերությունը կարելի է բացատրել մեր տարածաշրջանում կաթնամթերքների մեջ լակտոկոկերի գերակշիռ առկայությամբ:

Поступила 14.02.13

Выделение и характеристика вагинальных лактококков

Г.Г. Григорян, Г.Г. Оганесян

У четырех женщин репродуктивного возраста армянской популяции были взяты влагалищные мазки, инокулированы в обезжиренном молоке и засеяны на агаризованной среде MRS. В течение двух дней некоторые образцы молока свернулись, из них были изолированы лактококки, способные ферментировать молоко. Из засевов на агар, сделанных из ферментированных образцов молока, были выделены молочнокислые бактерии. На основании изучения морфокультуральных свойств трех культур было идентифицировано три грамположительных лактококковых штамма, одинаково хорошо растущих на средах MRS и LAPtg и свертывающих молоко монокультурой, которые, однако, отличались по скорости роста. Все отобранные лактококки обладали высокой антибактериальной активностью по отношению к условнопатогенной *E.coli*.

Isolation and characterization of vaginal lactococci

G.G. Grigoryan, H.G. Hovhannisyan

Vaginal smears were taken from four women of reproductive age in Armenia and inoculated in skim milk and plated on MRS agar. Within two days some of milk samples curdled. Lactic acid bacteria were isolated from fermented milk by plating on MRS. Based on the study of morphocultural and antibacterial properties, three Gram-positive lactococci and one lactobacillus were identified.

The obtained lactococci curdling milk in monoculture differ by their growth rate. All lactococci express very high antibacterial activity against *E.coli*.

Գրականություն

1. *Оганесян Г.Г., Барсегян А.А., Пашиаян М.М.* Изучение эффективности усвоения лактулозы вагинальными молочнокислыми бактериями *in vitro*. Мед. наука Армении НАН РА, 2011, т. LI. 3, s. 25-27.
2. *Boris S., Barbes C.* Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. *Microbes Infect.*, 2000, 4; 543-546.
3. *Diep D.B., Nes I.F.* Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria, *Curr. Drug Targets*, 2002, 3; 107-22.
4. *Klaenhammer T.R.* Bacteriocins of lactic acid bacteria, *Biochimie*, 1988, 70; 337-49.
5. *Larsen B., Monif G. R.* Understanding the bacterial flora of the female genital tract. *Clin. Infect. Dis.*, 2001, 32; 69-77.
6. *Lepargneur J.P., Rousseau V.* Protective role of the Doderlein flora. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod.*, 2002, 31; 485-494.
7. *Marteau P., J. C. Rambaud.* Potential of using lactic acid bacteria for therapy and immunomodulation in man. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1993, 12: 207-220.
8. *Pashayan M.M., Hovhannisyan H.G.* Isolation and characterization of vaginal lactobacilli producing hydrogen peroxide. *Zh. Mikrobiol. (Moscow)*, 2011, 6; 90-93
9. *Redondo-Lopez V., Cook R. L., Sobel, J. D.* Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. *Rev. Infect. Dis.*, 1990, 12; 856-872.
10. *Reid G., Burton J.* Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes Infect.*, 2002, 4; 319-324.
11. *Todorov S.D., Botes M., Danova S.T., Dicks L.M.T.* Probiotic properties of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* HV219, isolated from human vaginal secretions. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 103; 629-639.
12. *Van Niel E.W.J., Hahn-Hagerdal B.* Nutrient requirements of lactococci in defined growth media. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999, 52: 617-627.
13. *Zhou X., Bent S. J., Schneider M. G., Davis C.C., Islam.M. R., L. J. Forney.* Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. *Microbiology*, 2004, 150; 2565-2573.