

УДК 618.1: 579.2

Մայրական կաթից անջատված կաթնաթթվային բակտերիաների բնութագիրը

Լ.Վ. Դանիելյան

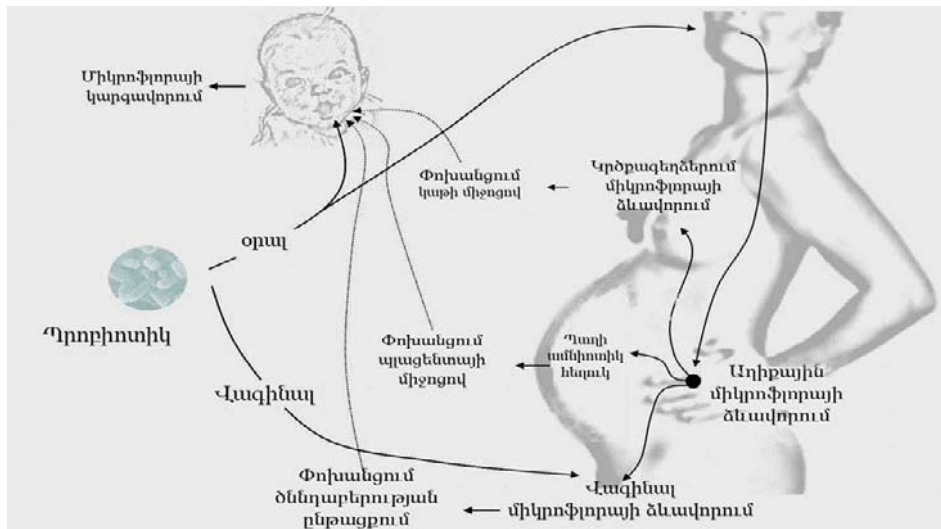
ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ
0056, Երևան, Գյուրջյան փ., 14

Բանալի բառեր՝ մայրական կաթ, լակտոբացիլներ, աճի արագություն

Մայրական կաթն իրենից ներկայացնում է բարդ կենսաբանական հեղուկ, որը պարունակում է նորածինների աճին անհրաժեշտ միկրոէլեմենտներ, սպիտակուցներ, ճարպեր, ածխաջրեր, ճարպալույծ վիտամիններ (A, E, K), հանքային էլեմենտներ՝ երկաթ, նատրիում, ֆոսֆոր, ցինկ, նաև A դասի իմունազլորուլիններ, հորմոններ, ֆերմենտներ, իմուն և աճի գործոններ, ինչպես նաև պրոբիոտիկ բակտերիաներ [3, 4, 6]:

Երկար տարիներ մայրական կաթը համարվում էր ստերիլ և ենթադրվում էր, որ կաթում առկա տարբեր գործոնների ազդեցության տակ նորածինների աղիներում ձևավորվում է նորմալ միկրոֆլորան [1, 3, 4]: Վերջին տարիների հետազոտությունների արդյունքում առաջ է քաշվել հիպոթեզ, որ հղիության վերջին եռամսյակում մոր աղիքային միկրոբիոտայից մանրէները ներքին ուղիով (enteromammary route) անցնում են կրծքագեղձեր և ձևավորում «Ժամանակավոր» միկրոֆլորա, որը վերանում է կաթնարտադրության ավարտի հետ (նկ. 1): Այստեղից կարելի է եզրակացնել, որ հղի կնոջ աղիքային միկրոֆլորան ունի ուղղակի ազդեցություն նորածինների առողջության վրա: Կրծքի կաթի բակտերիաները համարվում են առաջիններից, որ զաղությանում են նորածինների աղեստամոքսային համակարգը՝ կանխելով և կանխարգելելով ախտածին մանրէների աճը, հետևաբար իջեցնում են ինֆեկցիոն հիվանդություններով հիվանդանալու ռիսկը [1, 2, 4, 9]: Կարելի է համարել, որ մայրական կաթի մանրէները նպաստում են աղիների լորձաթաղանթում լիմֆոիդ հյուսվածքի ձևավորմանը, ունեն կանխարգելիչ և հակաալերգիկ ազդեցություն [3, 4, 7, 8]: Հետևաբար մայրական կաթից մեկուսացած բակտերիաները կարող են հանդիսանալ որպես թեկնածու պրոբիոտիկներ երեխաների աղեստամոք-

սային համակարգի և հղի կանանց կրծքագեղձերի զաղութացման համար՝ կանխելով մաստիտների առաջացումը [6, 7, 8]:



Նկ. 1. Մայրական կաթից անջատված բակտերիաների ծագումը

Կախված աշխարհագրական դիրքից, բնակլիմայական պայմաններից, կենսակերպից՝ տարբեր երկրների կանանց կրծքի կաթի միկրոֆլորան ներկայացված է բազմաթիվ տեսակների պատկանող լակտոբակտերիաներով [1-5, 8]: Հայաստանաբնակ կանանց մայրական կաթի միկրոֆլորայի ուսումնասիրություններ դեռևս արված չեն:

Տվյալ աշխատանքի խնդիրն է հանդիսացել հայաստանաբնակ կանանց կրծքի կաթից կաթնաթթվային բակտերիաների անջատումը, ուսումնասիրումը և նախնական նույնականացումը:

Նյութը և մեթոդները

Հետազոտության նյութ են հանդիսացել հայաստանաբնակ 22-28 տարեկան ծննդկանների կաթից անջատված լակտոբակտերիաները (*Lactobacillus* sp. LH25, LH26, LH27, LH28, LH29):

Աշխատանքում օգտագործվել են MRS (Himedia), Nutrient broth standard 1 (Serva), յուղագերծ կաթ, ածխաջրեր, H_2O_2 , օքսիդազային սկավառակներ (Himedia), Gram Staining Set (Ghatran, IIR):

Պահպանելով ասեպտիկայի և անտիսեպտիկայի կանոնները մի քանի օրվա ծննդկաններից վերցվել են կաթի նմուշներ և նոսրացումներով կուլտիվացվել ստերիլ կովի կաթում, սելեկտիվ ագարային

միջավայրերում: Ցանքսերը կատարվել են կաթի բոլոր նոսրացումներից, որպեսզի հնարավոր լինի անջատել այն կուլտուրաները, որոնք քիչ քանակությամբ են ներկայացված մայրական կաթում և ինկուբացվել 37°C պայմաններում: Մաքուր կուլտուրաներ ստանալու նպատակով ֆերմենտացված կաթի նմուշներից կատարվել են ցանքսեր սելեկտիվ միջավայրերում: Աճած գաղութներն ըստ իրենց մորֆոլոգիական հատկանիշների մաքրվել են և կրկին անգամ ստուգվել է նրանց կողմից կաթը ֆերմենտացնելու ունակությունը:

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

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

Ածխաջրերի յուրացումը ստուգվել է ըստ Բերջիի որոշիչի՝ 19 տարբեր շաքարների կիրառմամբ:

Արդյունքները և դրանց քննարկումը

Հայաստանաբնակ 22-28 տարեկան 10-15 օրյա ծննդկաններից վերցված մայրական կաթի հինգ նմուշների ուսումնասիրության արդյունքում պարզվեց, որ բոլորն էլ ընդունակ են ֆերմենտացնել կաթը, ինչը վկայում է նրանցում կաթնաթթվային բակտերիաների առկայության մասին: Իսկ MRS ագարի վրա արված ցանքսերի արդյունքում առաջացած գաղութների ուսումնասիրությունը ցույց տվեց մորֆոլոգիապես իրարից տարբերվող կուլտուրաների առկայությունը (աղ. 1):

Ինչպես երևում է աղ. 1-ից, ֆերմենտացված կաթերից ագարային միջավայրի վրա արված ցանքսերից առաջացած գաղութները տարբերվում են չափսերով և գունավորմամբ: Գաղութները բաժանվում են 3 հիմնական խմբերի՝ սպիտակ՝ 3 մմ, կաթնագույն՝ 1-1.5 մմ և կաթնագույն սպիտակ՝ 2-2.5 մմ տրամագծերով: Մանրադիտակային ուսումնասիրությունները ցույց տվեցին հինգ տարբեր ցուպիկային շտամներ: Անջատված կաթնաթթվային բակտերիաները գրամդրական են, օժտված չեն կատալազային և օքսիդազային ակտիվություններով:

Աղյուսակ 1

Մայրական կաթից անջատված կաթնաթթվային բակտերիաների և գաղութների մորֆոլոգիական հատկությունները (ներկումը ըստ Գրամի), կատալազային և օքսիդազային ակտիվությունները

Շտամի անվանումը	Գաղութների մորֆոլոգիան		Բջջիների մորֆոլոգիան		Գրամ	Կատալազ	Օքսիդազ
	տեսքը	չափ-սերը	տեսքը	չափսերը			
LH 25	կաթնագույն	1.0-1.5 մմ	ցուպիկ կարճ շղթաներ	1.0 x 2.5 մկմ	+	-	-
LH 26	կաթնագույն սպիտակ	2.0-2.5 մմ	ցուպիկ	1.0 x 3.0 մկմ	+	-	-
LH 27	կաթնագույն	1.0-2.0 մմ	ցուպիկ երկար շղթաներ	1.0 x 1.5 մկմ	+	-	-
LH 28	սպիտակ	3.0 մմ	ցուպիկ շղթաներ	1.0 x 3.0 մկմ	+	-	-
LH 29	կաթնագույն	1.0 մմ	ցուպիկ	0.5 x 1.0 մկմ	+	-	-

Կաթը ֆերմենտացնելու ունակությունները և անջատված շտամների կուլտուրալ հատկանիշները ներկայացված են աղ. 2-ում:

Աղյուսակ 2

Մայրական կաթից անջատված կաթնաթթվային բակտերիաների կուլտուրալ հատկությունները

Շտամի անվանումը	Աճը MRS-ում 37°C- ի տակ		Կաթի ֆերմենտացումը	Աճը մինիմալ միջավայրում
	աերոբ	անաերոբ		
LH 25	++	+++	+++	-
LH 26	+++	+++	++	-
LH 27	++	++	++	-
LH 28	+++	+++	++	-
LH 29	++	++	++	-

Աղյուսակ 2-ում ներկայացված տվյալները վկայում են այն մասին, որ անջատված կաթնաթթվային բակտերիաների շտամները աճում են աերոբ և անաերոբ պայմաններում և մոնոկուլտուրայով ֆերմենտացնում են կաթը: Մինիմալ միջավայրի վրա աճի բացակայությունը հաստատում է այն փաստը, որ կաթնաթթվային բակտերիաները պոլիաուքսոտրոֆ են և կարիք ունեն մեկ տասնյակից ավելի տարբեր աճի գործոնների՝ վիտամինների, ամինաթթուների և նուկլեինաթթուների [10]:

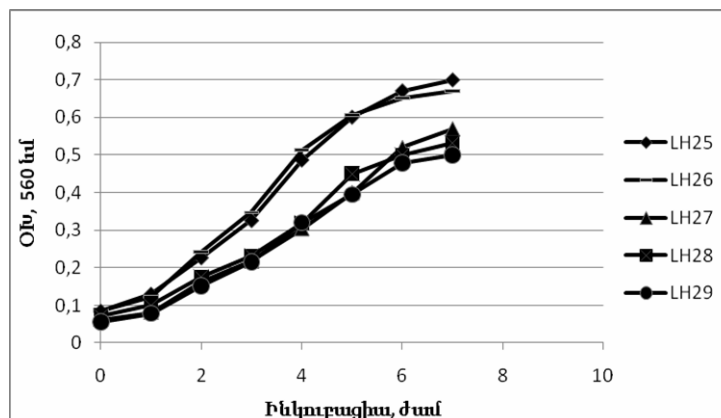
Աղյուսակ 3

Շտամների կողմից ածխաջրերի յուրացման պրոֆիլը

ԿԹԲ	Առաբինոզ	Ցելոբիոզ	Ֆրուկտոզ	Գալակտոզ	Գլյուկոզ	Լակտոզ	Մալտոզ	Մաննիտ	Մելիթիոզ	Մելիբիոզ	Ռաֆինոզ	Ռամնոզ	Ռիբոզ	Սալիցին	Սորբիտ	Սախարոզ	Տրեգալոզ	Քսիլոզ	Ինուլին
L H2 5	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
L H2 6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+
L H2 7	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-
L H2 8	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
L H2 9	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-

Աղյուսակ 3-ում ներկայացված է անջատված շտամների կողմից 19 տարբեր ածխաջրերի յուրացումը, որտեղից երևում է, որ այդ կուլտուրաները տարբերվում են միմյանցից շաքարների յուրացման պրոֆիլով: Համաձայն Բերջիի բակտերիաների որոշիչի՝ անջատված շտամներից երկուսը LH26-ը և LH29-ը պատկանում են *L. casei sp. rhamnosus*, LH25-ը՝ *L. casei sp. casei*, LH27-ը՝ *L. salivarius*, LH28՝ *L. casei sp. plantarium* տեսակներին:

Ուսումնասիրվել է անջատված շտամների աճի օրինաչափությունները MRS միջավայրում ինտենսիվ աերացիայի պայմաններում (նկ. 2):



**Նկար 2. Լակտոբակտերիաների աճի օրինաչափությունները MRS
միջավայրում ինտենսիվ աերացիայի պայմաններում**

Նկար 2-ում ներկայացված կորերից երևում է, որ շտամներից երկուսը՝ LH25 և LH26-ը համեմատաբար ավելի լավ են աճում և կուտակում մեծ կենսազանգված:

Այսպիսով, ընդհանրացնելով ստացված արդյունքները, կարելի է ասել, որ մայրական կաթը պարունակում է տարբեր տեսակների պատկանող կուլտիվացվող կաթնաթթվային բակտերիաներ, որոնք կարող են հանդես գալ որպես թեկնածու պրոբիոտիկներ հղի կանանց կրծքագեղձերի և երեխաների աղիների գաղութացման համար [4, 5]:

Поступила 04.05.16

**Характеристика молочнокислых бактерий, выделенных
из материнского молока**

Л.В. Даниелян

В последние годы анализы микробного разнообразия грудного молока показали, что грудное молоко является источником живых молочнокислых бактерий, важных для формирования кишечной микрофлоры грудного ребенка.

Целью данного исследования является выделение молочнокислых бактерий из грудного молока. Образцы грудного молока ($n = 5$) были взяты у здоровых женщин в ранний лактационный период. Грудное молоко в 10-кратных разведениях было инокулировано в стерильном обезжиренном коровьем молоке и на агаризованной среде и инкубировано при 37°C . Были выделены лактобациллы, способные ферментировать молоко. На основании изучения морфокультуральных свойств были выделены 5 грамположительных штаммов, хорошо растущих на средах MRS и монокультурой свертывающих молоко.

Characterization of lactic acid bacteria isolated from breast milk

L.V. Danielyan

In recent years the analyses of microbial diversity of breast milk have shown that it is the source of alive lactic acid bacteria important for the formation of intestinal microflora of infant.

The aim of this study is the isolation of lactic acid bacteria from breast milk. Samples of breast milk ($n = 5$) were taken from healthy women in the early lactation period. Breast milk in 10-fold dilution was inoculated in sterile skim cow milk and on agar medium incubated at 37 °C. Lactobacilli capable of fermenting milk were isolated. Based on the study of morpho-cultural properties, 5 Gram-positive strains that grew well on MRS media and led to the fermentation of milk by monoculture were isolated.

Գրականություն

1. 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, 2, Vol. 3.
2. Beasley S.S., Saris P.E.J. Nisin-producing *Lactococcus lactis* strains isolated from human milk. Applied and Environment Microbiology, 2004, 70: 5051–3.
3. 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), p. 1-10.
4. Jeurink P.M., Bergenhenegouwen J., Jimenez E et al. Human milk: a source of more life than we imagine. Wageningen Academic Publishers. Beneficial Microbes, 2013, 4 (1): 17-30.
5. 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, 143, 754-758. (2003).
6. Martín, R., Langa, S., Reviriego et al. The commensal microflora of human milk: New perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. Trends in Food Science & Technology, 2003, 15, 121-127.
7. Olivares M., Díaz-Ropera M.P., Martín R. et al. Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. Journal of Applied Microbiology; 2006, 101: 72–9.
8. Perez-Caro F.J., Dong H. and Yaqoob P. In vitro immunomodulatory activity of *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 and *Lactobacillus salivarius* CECT 5713: two probiotic strains isolated from human breast milk. Immunobiology, 2010, 215: 996-1004.
9. Sinkiewicz G., Ljunggren L. Occurrence of *Lactobacillus reuteri* in human breast milk. Microb. Ecol. Health Dis., 2008, 20:122-126.
10. Van Niel E.W.J., Hahn-Hagerdal B. Nutrient requirements of lactococci in defined growth media. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 52: 617-627.