

ՀՀ ԳԱԱ «ՀԱՅԿԵՆՍԱՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱ» ԳԱԿ ՊՈԱԿ

ՄԱԹԵՎՈՍՅԱՆ ԼՈՒՍԻՆԵ ԱՇՈՏԻ

**ԿԱԹՆԱԹԹՎԱՅԻՆ ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ՏԱՐԲԵՐ ՀԱՄԱԿԵՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ
ՀԱԿԱՄԱՆՐԵԱՅԻՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ**

**Գ.00.07 - «Միկրոբիոլոգիա. կենսատեխնոլոգիա» մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության**

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ 2020

НПЦ «АРМБИОТЕХНОЛОГИЯ» НАН РА ГНКО

МАТЕВОСЯН ЛУСИНЕ АШОТОВНА

**ПРОТИВОМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ АССОЦИАЦИЙ
МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ**

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.00.07 - «Микробиология. биотехнология»**

ЕРЕВАН 2020

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ԵՊՀ Կենսաբանության
ֆակուլտետում:

Գիտական ղեկավար՝

ՀՀ ԳԱԱ թղթակից անդամ,
կ.գ.դ., պրոֆեսոր Ա. Հ. Թռչունյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝

կ.գ.դ. Ն. Ս. Վարդանյան
կ.գ.թ. Կ. Վ. Չիտչյան

Առաջատար կազմակերպություն՝

Հայաստանի ազգային ագրարային
համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը կայանալու է 2020թ. մարտի 13
-ին, ժամը 15⁰⁰ - ին ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում գործող ՀՀ
ԲՈԿ-ի Կենսատեխնոլոգիայի 018 մասնագիտական խորհրդի նիստում:

Հասցե՝ 0056, ՀՀ, ք. Երևան, Գյուրջյան փողոց, 14, հեռ/ֆաքս (374 10) 65 41
80:

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա»
ԳԱԿ-ի գրադարանում:

Սեղմագիրն առաքված է 2020թ. հունվարի 31-ին:

Մասնագիտական խորհրդի
գիտական քարտուղար, կ.գ.թ.

Գ. Ե. Ավետիսովա

Тема диссертации утверждена в биологическом факультете ЕГУ.

Научный руководитель:

член-корреспондент НАН РА
д.б.н., профессор А. А. Трчунян

Официальные оппоненты:

д.б.н. Н. С. Варданян
к.б.н. К. В. Читчян

Ведущая организация:

Национальный аграрный университет Армении

Защита диссертации состоится 13 марта 2020г. в 15⁰⁰ часов на заседании
специализированного совета 018 Биотехнологии ВАК РА при НПЦ
«Армбиотехнология» НАН РА.

Адрес: 0056, РА, г. Ереван, ул. Гюрджяна 14, тел./ факс (374 10) 65 41 80.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НПЦ «Армбиотехнология»
НАН РА.

Автореферат разослан 31 января 2020г.

Ученый секретарь специализированного совета,
к.б.н.

Г. Е. Аветисова

Աշխատանքի արդիականությունը: Սննդամթերքի և անասնակերի աղտոտիչներ հանդիսացող զանազան ախտածին բակտերիաները, խմորասնկերը և բորբոսասնկերը լուրջ սպառնալիք են ներկայացնում դրանց պահպանման համար՝ պատճառ դառնալով հսկայական տնտեսական կորուստների ամբողջ աշխարհում (Legan 1993, Schnürer and Magnusson 2005): Որոշ բորբոսասնկեր արտադրում են առողջության համար վտանգավոր տարբեր սնկաթույներ, որոնցից են, օրինակ, աֆլատոքսինները, տրիխոտեցինները, ֆունոնիզինները, օխրատոքսին Ա-ն և պաթուլինը (De Muynck et al 2004, Pitt and Hocking 1999, 2009): Ախտածին միկրոօրգանիզմների՝ հակաբիոտիկների նկատմամբ դրսևորած կայունությունը, ինչպես նաև սննդամթերքի և կերի արտադրությունում դրանց աճի կանխարգելման անհրաժեշտությունը պատճառ հանդիսացան սննդամթերքի մանրէաբանական վերահսկողության ուժեղացման, ինչպես նաև նոր, արդյունավետ և բնական ծագում ունեցող պատրաստուկների ստացման նպատակով առավել անվտանգ և ժամանակակից ռազմավարության մշակման և ներդրման (WHO 2014): Այդ տեսակետից կարևորվում է կաթնաթթվային բակտերիաների (ԿԹԲ) դերը, որոնք հանդես են գալիս որպես սննդի և կերի անփոխարինելի մանրէաբանական կենսապահպանիչներ, մարդու և կենդանիների աղիքային միկրոբիոտայի կարևոր բաղադրիչներ, ինչպես նաև մեծ հետաքրքրություն և պահանջարկ են ձեռք բերել իրենց հակաօքսիդանտային, հակաալերգեն և հակաուռուցքային ակտիվության շնորհիվ (Movsesyan et al 2010, Ljungh and Wadström 2009): *Lactobacillus* ցեղի ներկայացուցիչները ամենատարածվածն են ԿԹԲ խմբում, քանզի դրանք արտադրում են զանազան հակամանրէային արգասիքներ (Nes et al 2011): Տարբեր միկրոտարրեր ևս զգալի ազդեցություն են թողնում դրանց արտադրության վրա, հատկապես այն մետաղները, որոնք ապահովում են բջջի գործունեությունը և ընդգրկված են կենսական նշանակություն ունեցող ֆերմենտների կազմում (Riordan 1977): Դրանցից են կալցիումը (Ca^{2+}) և մագնեզիումը (Mg^{2+}): Կենսապահպանման տեսանկյունից կարևոր է ոչ միայն ուսումնասիրել կաթնամթերքում առկա բնական համակեցությունները, այլև ստեղծել ԿԹԲ շտամներից կազմված նոր և արդյունավետ համակեցություններ, ուսումնասիրել դրանց հակամանրէային հատկությունները, ինչը հեռանկարներ կբացի նոր հակամանրէային պատրաստուկների ստացման և արտադրությունում դրանց հնարավոր կիրառության համար:

Աշխատանքի նպատակը և խնդիրները: Հայաստանի տարբեր մարզերի գյուղական տնտեսությունների ավանդական կաթնամթերքից, ինչպես նաև մեղուների աղեստամոքսային ուղուց մեկուսացված ԿԹԲ շտամներից նոր համակեցությունների ստեղծումը, դրանց հակամանրէային ակտիվության ուսումնասիրությունը և առավել արդյունավետ համակեցությունների ընտրությունը: Խնդիրներն են՝

1. Ուսումնասիրել ԿԹԲ շտամների հակամանրէային (հակաբակտերիային և հակասնկային) ակտիվությունը և ընտրել առավել բարձր ակտիվությամբ օժտված շտամներ,
2. Ուսումնասիրել ֆիզիկական գործոնների ազդեցությունը ԿԹԲ հակասնկային ակտիվության վրա,
3. Պարզաբանել հակասնկային ակտիվության համար պատասխանատու միացության/ների բնույթը,
4. Ստեղծել բարձր հակամանրէային ակտիվությամբ օժտված ԿԹԲ շտամներից նոր արժեքավոր համակեցություններ,
5. Պարզաբանել ԿԹԲ շտամների հավանական անտագոնիզմը,
6. Հետազոտել ստեղծված ԿԹԲ համակեցությունների հակասնկային ակտիվությունը,
7. Ուսումնասիրել ԿԹԲ համակեցությունների հակաբակտերիային ակտիվությունը՝ կախված աճեցման սննդամիջավայրից և աճեցման պայմաններից,
8. Ուսումնասիրել ԿԹԲ շտամների և դրանց համակեցությունների հակամանրէային ակտիվության վրա մետաղական իոնների (Ca^{2+} , Mg^{2+}) ազդեցությունը և որոշել յուրաքանչյուր շտամի և համակեցության համար այդ իոնների օպտիմալ կոնցենտրացիան:

Գիտական նորույթը:

- Հաստատվել է *L. rhamnosus* MDC 9661 շտամի հակասնկային ակտիվությամբ օժտված նյութի/երի սպիտակուցային բնույթը և դրանց հավանական կապվածությունը բջջապատի հետ:
- Առաջին անգամ ցույց է տրվել, որ ԿԹԲ համակեցությունները դրսևորում են առավել բարձր հակաբակտերիային ակտիվություն ՄՌՇ-արգանակում՝ շտամների համատեղ աճեցման, իսկ կաթում՝ ժամանակային առումով տարանջատված աճեցման դեպքում:
- Բացահայտվել է Ca և Mg իոնների խթանիչ ազդեցությունը ինչպես ԿԹԲ շտամների, այնպես էլ դրանց համակեցությունների հակամանրէային ակտիվության վրա:
- Առաջին անգամ ցույց է տրվել, որ գոյություն ունի յուրահատուկ կապ ԿԹԲ համակեցությունների հակաբակտերիային ակտիվության վրա մետաղական իոնների ազդեցության և աճեցման պայմանների միջև:

Կիրառական նշանակությունը: ԿԹԲ համակեցությունների ստեղծումը, կենսաբանական հատկությունների ուսումնասիրությունը, հակամանրէային տիրույթի մեծացման նպատակով մետաղական իոնների դերի ուսումնասիրությունը և կիրառական նշանակություն ունեցող համակեցությունների ընտրությունը կարող են հիմք հանդիսանալ նոր և արդյունավետ հակամանրէային պատրաստուկների ստացման համար:

Կապը գիտական թեմաների հետ: Աշխատանքը կատարվել է ՀՀ Կրթության և գիտության նախարարության Գիտության պետական կոմիտեի բազային ֆինանսավորման, ինչպես նաև Գիտության և կրթության հայկական ազգային հիմնադրամի (ANSEF) կողմից տրամադրված ֆինանսավորման միջոցներով (#Biotech-3474, 4431):

Հեղինակի անձնական ներդրումը: Հեղինակի անձնական ներդրումը ներառում է աշխատանքի նախագծումը, փորձարարական հետազոտությունների իրականացումը, ատենախոսության թեմային վերաբերող գիտական գրականության ուսումնասիրությունը, արդյունքների համեմատական վերլուծությունը, գիտական հոդվածների, դրույթների և ատենախոսության ձևակերպումը: Աշխատանքի հիմնական խնդիրների սահմանումը, մեթոդների մշակումը, հետազոտության արդյունքների քննարկումը և վերլուծությունը կատարվել են գիտական ղեկավար, ՀՀ ԳԱԱ թղթակից անդամ, Կ.գ.դ., պրոֆեսոր Ա.Հ. Թոչունյանի և Կ.գ.թ., դոցենտ Ի.Լ. Բազուկյանի հետ:

Աշխատանքի ապրոքացիան: Ատենախոսության թեմայով հետազոտությունների արդյունքները զեկուցվել են “Երկխոսություններ գիտության մասին” երիտասարդ գիտնականների երրորդ միջազգային գիտաժողովում (ՀՀ ԳԱԱ “Հայկենսատեխնոլոգիա” ԳԱԿ ՊՈԱԿ, 23-26 հունիսի, 2015, Երևան), “Կենսատեխնոլոգիա՝ գիտություն և պրակտիկա” երիտասարդ գիտնականների չորրորդ միջազգային գիտաժողովում (ՀՀ ԳԱԱ “Հայկենսատեխնոլոգիա” ԳԱԿ ՊՈԱԿ, 28-30 սեպտեմբերի, 2017, Երևան), “Ախտածինների հետազոտության ընթացիկ զարգացումները” աշխատաժողովում (Էրեբունի պլազա բիզնես կենտրոն, 25-30 մարտի, 2019, Երևան), “Մանրէներ. կենսաբանությունը և կիրառությունը” միջազգային գիտաժողովում (ՀՀ ԳԱԱ “Հայկենսատեխնոլոգիա” ԳԱԿ ՊՈԱԿ, 9-11 հոկտեմբերի, 2019, Երևան), ինչպես նաև ԵՊՀ Կենսաբանության ֆակուլտետի կենսաքիմիայի, մանրէաբանության և կենսատեխնոլոգիայի ամբիոնում կազմակերպվող տարեկան հաշվետվությունների ընթացքում:

Հրատարակված աշխատություններ: Ատենախոսության թեմայով հետազոտությունների արդյունքները հրատարակված են 5 գիտաժողովի թեզիսներում և 4 գիտական հոդվածներում:

Աշխատանքի կատարման վայրը: Աշխատանքը կատարվել է ԵՊՀ Կենսաբանության ֆակուլտետի կենսաքիմիայի, մանրէաբանության և կենսատեխնոլոգիայի ամբիոնում:

Ատենախոսության ծավալը և կառուցվածքը: Աշխատանքը բաղկացած է ներածությունից, գրական ակնարկից, հետազոտությունների նյութերից և մեթոդներից, հետազոտությունների արդյունքներից և դրանց քննարկումից, եզրակացություններից, գրականության ցանկից, գիտագործնական

առաջարկներից և հապավումների ցանկից: Աշխատանքը շարադրված է 124 էջի սահմաններում և ներառում է 13 աղյուսակ, 26 նկար և 177 գրական հղում:

ԳԼՈՒԽ 1. ԳՐԱԿԱՆ ԱԿՆԱՐԿ

Գրական ակնարկը բաղկացած է 5 բաժիններից, որտեղ ներկայացված են ԿԹԲ ընդհանուր բնութագիրը, տարածվածությունը և դասակարգումը, նկարագրված են հակաբակտերիային և հակասնկային ակտիվությունները, մետաղական իոնների դերը ԿԹԲ աճի և հակամանրէային ակտիվության դրսևորման գործընթացում, ԿԹԲ կիրառության հեռանկարները, ինչպես նաև կաթնամթերքում առկա մանրէային համակեցությունները:

ԳԼՈՒԽ 2. ՆՅՈՒԹԵՐ ԵՎ ՄԵԹՈԴՆԵՐ

Հետազոտության օբյեկտներ են հանդիսանում Երևանի պետական համալսարանի Կենսաբանության ֆակուլտետի կենսաքիմիայի, մանրէաբանության և կենսատեխնոլոգիայի ամբիոնում պահպանվող ԿԹԲ շտամները, որոնք մեկուսացվել են Հայաստանի տարբեր մարզերի գյուղական տնտեսությունների ավանդական կաթնամթերքից, ինչպես նաև մեղուների աղեստամոքսային ուղուց: Օգտագործվել են հետևյալ սննդամիջավայրերը՝ յուղազրկված կաթ («Կաթնառատ» ՍՊԸ), ՄՈՇ (Himedia, Հնդկաստան), քաղցու և քաղցու-ազար, Սաբուրո, Լուրիա Բերտրանի (LB), ձևափոխված ՄՈՇ, կաթ-ցիտրատ ազար (ԿՑԱ): ԿԹԲ հավանական անտագոնիզմի ուսումնասիրությունը կատարվել է ազարում դիֆուզիայի մեթոդով (Ndagano et al 2011): Համակեցությունների ստեղծումը կատարվել է համաձայն փորձարկումների մաթեմատիկական նախագծման (Goers et al 2014): ԿԹԲ շտամների և դրանց համակեցությունների հակասնկային ակտիվությունը որոշվել է ազարում մասնակի (խմորասնկերի դեմ) և ամբողջական (թորթոսասնկերի դեմ) դիֆուզիայի մեթոդով (Ndagano et al 2011): Իրականացվել են հետազոտություններ pH-ից և ջերմաստիճանային պայմաններից հակասնկային ակտիվության կախվածության, բջջապատի հետ ԿԹԲ հակասնկային նյութի/երի կապվածության, սնկասպան և սնկաստատիկ ակտիվության որոշման, հակասնկային նյութի/երի բնույթի պարզաբանման և տարանջատման ուղղությամբ: ԿԹԲ շտամների և դրանց համակեցությունների հակաբակտերիային ակտիվությունը որոշվել է կաթում և ՄՈՇ արգանակում՝ ազարում մասնակի դիֆուզիայի մեթոդով: ԿԹԲ համակեցությունների հակաբակտերիային հատկությունները ուսումնասիրվել են աճեցման 2 եղանակով (ԿԹԲ շտամների համատեղ և ժամանակային առումով տարանջատված աճեցում 37°C-ում): ԿԹԲ-ով ստացված կազեինային հիդրոլիզատների հակաբակտերիային ակտիվությունը որոշվել է ազարում մասնակի դիֆուզիայի մեթոդով: ԿԹԲ հակամանրէային ակտիվության վրա մետաղական իոնների ազդեցության գնահատման համար ԿԹԲ աճեցվել են

5, 8, 10 և 12 մՄ Ca^{2+} և Mg^{2+} պարունակող սննդամիջավայրում: Հետազոտությունների արդյունքում ստացված տվյալները ենթարկվել են վիճակագրական վերլուծության՝ համաձայն Սթյուդենթի թեստի (տվյալների հավաստիության գնահատման համար կիրառվել է R Project for Statistical Computing version R 3.1.1 ծրագիրը): Աշխատանքում ներկայացված տվյալները համարվում են հավաստի ($p < 0,05$), եթե այլ արժեք հաջորդիվ դիտարկված չէ:

ԳԼՈՒԽ 3. ՓՈՐՁՆԱԿԱՆ ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐ

3.1. ԿԹԲ շտամների հակամանրէային ակտիվության ուսումնասիրությունը
Իրականացվել են հետազոտություններ Հայաստանի տարբեր շրջանների գյուղական տնտեսությունների կաթնամթերքի զանազան նմուշներից, ինչպես նաև մեղուների աղեստամոքսային ուղուց մեկուսացված ԿԹԲ շտամների հակամանրէային ակտիվության գնահատման ուղղությամբ):

Աղ. 1 ԿԹԲ շտամների հակասնկային ակտիվությունը

Սունկ ԿԹԲ շտամ	<i>Mucor plumbeus</i>	<i>Penicillium aurantio-violaceum</i>	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Cladosporium herbarum</i>	<i>Trichoderma viride</i>	<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>
<i>L. rhamnosus</i> MDC 9661	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> RIN-2003-Ls	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> MDC 9632	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> MDC 9633	-	-	-	+	+/-	-	-	-	+	-
<i>S. thermophilus</i> VKPM B-3386	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecium</i> INR-2010-Tsov-G-St	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

(+) – հակասնկային ակտիվության առկայություն $/10^4$ սնկերի սպորների աճի արգելակում, (-) – հակասնկային ակտիվության բացակայություն, (+/-) – սպորառաջացման երկարաձգում

Ամենաբարձր հակասնկային ակտիվությամբ օժտված է *L. rhamnosus* MDC 9661 շտամը, որը դրսևորել է արգելակիչ ակտիվություն խմորասնկերի և գրեթե բոլոր փորձարկված բորբոսասնկերի նկատմամբ՝ երկարաձգելով միայն *A. flavus*-ի սպորառաջացումը: Մնացած ԿԹԲ շտամները արգելակիչ ակտիվություն դրսևորել են բորբոսասնկերից միայն *Fusarium oxysporum*-ի և *Cladosporium herbarum*-ի նկատմամբ: Ոչ բոլոր շտամներն են ունակ ճնշել *Candida albicans* և *Debaryomyces hansenii* խմորասնկերի աճը (Աղ. 1):

ԿԹԲ շտամների հակաբակտերիային ակտիվության ուսումնասիրության արդյունքները ցույց տվեցին, որ արգելակիչ ակտիվության ուժգնությունը կախված է աճեցման սննդամիջավայրի կազմից, ինչպես նաև շտամի յուրահատկությունից (Աղ. 2):

Աղ. 2 ԿԹԲ շտամների հակաբակտերիային ակտիվությունը, Փ մմ

Թեստ- օրգանիզմ ԿԹԲ շտամ	Սննդամիջ- վայր	<i>Escherichia</i> <i>coli</i> VKPM- M17	<i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i> MDC 1759	<i>Micrococcus</i> <i>luteus</i> WT	<i>Pseudo-</i> <i>monas</i> <i>aeruginosa</i> WT 27286	<i>Staphylo-</i> <i>coccus</i> <i>aureus</i> MDC 5233	<i>Bacillus</i> <i>mesentericus</i> WT	<i>Bacillus</i> <i>subtilis</i> WT- A1
<i>L. rhamnosus</i> MDC 9661	Կաթ	13±0,5*	16±0,5	18±0,6	13±0,5	17±0,5	-	-
	ՄՈՇ	11±0,5	14±0,5	10±0,5	10±0,5	18±0,6	10±0,5	-
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulga-</i> <i>ricus</i> RIN- 2003-Ls	Կաթ	12±0,5	15±0,5	18±0,6	10±0,5	18±0,6	-	11±0,5
	ՄՈՇ	12±0,5	12±0,5	9±0,5	9±0,5	-	11±0,5	-
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> MDC 9632	Կաթ	12±0,5	13±0,5	17±0,6	-	15±0,5	11±0,5	11±0,5
	ՄՈՇ	12±0,5	12±0,5	9±0,5	11±0,5	-	11±0,5	-
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulga-</i> <i>ricus</i> MDC 9633	Կաթ	12±0,5	15±0,5	18±0,6	10±0,5	16±0,5	10±0,5	-
	ՄՈՇ	11±0,5	13±0,5	12±0,5	10±0,5	11±0,5	10±0,5	-
<i>S. thermophilus</i> VKPM B- 3386	Կաթ	10±0,5	12±0,5	16±0,5	-	12±0,5	-	-
	ՄՈՇ	12±0,5	12±0,5	9±0,5	10±0,5	18±0,6	10±0,5	-
<i>E. durans</i>	Կաթ	10±0,5	12±0,5	17±0,6	-	12±0,5	-	-
	ՄՈՇ	12±0,5	11±0,5	9±0,5	10±0,5	20±0,5	10±0,5	-
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulga-</i> <i>ricus</i> B7	Կաթ	-	12±0,5	17±0,6	9±0,5	15±0,5	9±0,5	-
	ՄՈՇ	11±0,5	15±0,5	9±0,5	11±0,5	13±0,5	16±0,5	-

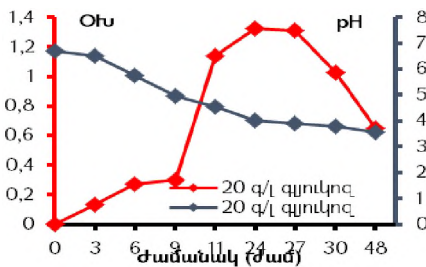
*Թեստ-օրգանիզմի աճի բացակայության գոտիներ, ստանդարտ շեղում Փ մմ

Հետազոտված շտամների մեծամասնությունը իր հակաբակտերիային ակտիվությունը առավելապես դրսևորել է կաթում՝ փորձարկված 7 թեստ-օրգանիզմներից 5-ի նկատմամբ: Աճի բացակայության ամենամեծ գոտիները դիտվել են *Salmonella typhimurium*, *Micrococcus luteus* և *Staphylococcus aureus* թեստ-օրգանիզմներում: ՄՈՇ արգանակում դիտվել է համեմատաբար ավելի ցածր արգելակիչ ակտիվություն, բացառությամբ *Bacillus mesentericus*-ի, որի աճը զգալիորեն ճնշվել է ՄՈՇ արգանակում աճեցված շտամների կողմից:

3.2 *Lactobacillus rhamnosus* MDC 9661 շտամի հակասնկային նյութի/երի որոշ հատկություններ, բնույթի պարզաբանումը և տարանջատումը

Հետազոտվել է *L. rhamnosus* MDC 9661 շտամի հակասնկային ակտիվության վրա ֆիզիկական գործոնների ազդեցությունը, ինչպես նաև փորձ է արվել տարանջատել հակասնկային նյութը/երը և պարզաբանել վերջինիս բնույթը:

MDC 9661 շտամի՝ 37°C-ում 24 ժամ աճեցրած կուլտուրան ցուցաբերում է շատ թույլ հակասնկային ակտիվություն: Հակասնկային ակտիվությունը դրսևորվում է 48 ժամ աճեցումից հետո (Նկ. 1):



Ա

Բ

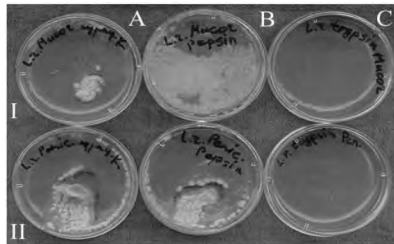
Նկ. 1. *L. rhamnosus* MDC 9661-ի հակասնկային ակտիվության կախվածությունը աճեցման տևողությունից

Ձախից՝ աճի և թթվառաջացման կորերը, աջից՝ հակասնկային ակտիվության դրսևորումը.

Ա - 24 ժամ աճեցումից հետո, Բ - 48 ժամ աճեցումից հետո

37°C-ում 48ժ աճեցումից հետո MDC 9661-ը պահպանում է իր հակասնկային ակտիվությունը *P. aurantioviolaceum*-ի և *M. plumbeus*-ի նկատմամբ pH-ի արժեքների լայն տիրույթում՝ 3-10: Մյուս կողմից, 37°C-ում 48ժ աճեցումից հետո MDC 9661-ի կուլտուրային հեղուկի մշակումը տարբեր ջերմաստիճանային պայմաններում (45°C-80°C) ցույց տվեց, որ հակասնկային ակտիվությունը ունի բարձր զգայունություն ջերմաստիճանի նկատմամբ: MDC 9661-ի վերնստվածքային հեղուկում հակասնկային ակտիվություն չի դրսևորվել, մինչդեռ -30°C-ում 30ր պահպանված, լիզոցիմով մշակված և ուլտրաձայնով դեզինտեգրացված բջջապատի մասնիկները պահպանում են իրենց հակասնկային ակտիվությունը: Այսպիսով, կարելի է եզրակացնել, որ MDC 9661-ի հակասնկային ակտիվությունը համակցված է բջջապատի հետ: MDC 9661-ի սնկասպան և սնկաստատիկ ակտիվության ուսումնասիրությունը ցույց տվեց, որ ԿԹԲ պարունակող ՄՌՀ սննդամիջավայրով Պետրիի թասիկների մակերեսին տեղադրված մանրէազերծ բակտերիական ֆիլտրից թարմ ՄՌՀ սննդամիջավայր տեղափոխված սնկերի սպորները 20°C-ում 10 օր կուլտիվացվելուց հետո ոչ մի աճ չդրսևորեցին, ինչը թույլ է տալիս եզրակացնել, որ MDC 9661-ը ունի սնկասպան ակտիվություն:

MDC 9661-ի կուլտուրայի մշակումը պրոտեինազ K-ով և պեպսինով ճնշել է հակասնկային ակտիվությունը *M. plumbeus*-ի և *P. aurantioviolaceum*-ի նկատմամբ, մինչդեռ տրիպսինով մշակումից հետո MDC 9661-ի հակասնկային ակտիվությունը պահպանվել է (Նկ. 2):



Նկ. 2. Տարբեր ֆերմենտների ազդեցությունը *L. rhamosus* MDC 9661-ի հակասնկային ակտիվության վրա

I - *M. plumbeus*-ի աճի ճնշումը, II - *P. aurantioviolaceum*-ի աճի ճնշումը: A - MDC 9661-ի կուլտուրային հեղուկը՝ մշակված պրոտեինազ K-ով, B - MDC 9661-ի կուլտուրային հեղուկը՝ մշակված պեպսինով, C - MDC 9661-ի կուլտուրային հեղուկը՝ մշակված տրիպսինով:

Արդյունքները թույլ են տալիս ենթադրել, որ MDC 9661-ի հակասնկային նյութը/երը ունի սպիտակուցային բնույթ: MDC 9661-ի հակասնկային նյութի տարանջատման նպատակով կատարված ուսումնասիրությունները ցույց տվեցին, որ ո՛չ 2 և 4Մ միզանյութը, 20% տվին 80-ը և 20% տրիտոն X-100-ը առանձին-առանձին, ո՛չ դրանց համակցված խառնուրդը չկարողացան տարանջատել հակասնկային նյութը լիզոցիմով և ուլտրաձայնով դեզինտեգրացված բջիջներից: Այսպիսով՝ կարելի է եզրակացնել, որ MDC 9661-ի հակասնկային նյութը/երը կապված է միայն ինտակտ (չվնասված) բջիջների հետ:

3.3 ԿԹԲ համակեցությունների հակասնկային ակտիվության ուսումնասիրությունը

ԿԹԲ 15 տարբեր համակեցությունների հակասնկային ակտիվության ուսումնասիրությունը ցույց տվեց, որ դրանք դրսևորում են գրեթե նույն արգելակիչ ակտիվությունը խմորասնկերի և բորբոսասնկերի նկատմամբ, ինչ դրանց կազմում ընդգրկված շտամները առանձին-առանձին: Սակայն հետաքրքիր է նշել, որ MDC 9661-ի հակասնկային ակտիվությունը այլ ԿԹԲ շտամների (VKPM B-3386, RIN-2003-Ls, MDC 9632, MDC 9633 և INR-2010-Tsov-G-St) հետ համակեցություններում զգալիորեն ճնշվել է: Մասնավորապես, MDC 9661-ը կորցնում է իր ակտիվությունը *P. aurantioviolaceum*-ի և *G. candidum*-ի նկատմամբ VKPM B-3386-ի հետ համակեցությունում, իսկ RIN-2003-Ls-ի հետ համակեցությունում ճնշվում է նաև արգելակիչ ակտիվությունը *A. flavus*-ի նկատմամբ: MDC 9661-ի համակեցությունները MDC 9632 և MDC 9633 շտամների հետ չեն կարողացել ճնշել *M. plumbeus*, *P. aurantioviolaceum*,

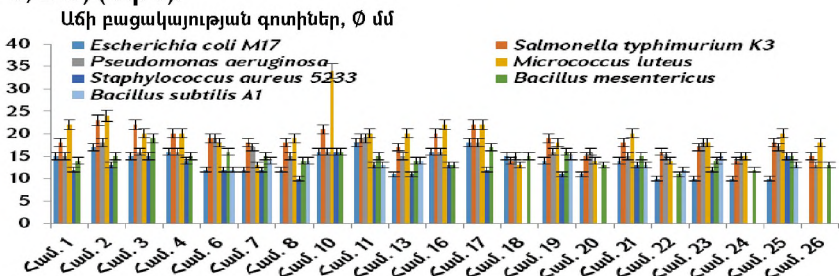
T. viride և *A. flavus* բորբոսասնկերի աճը: Եվ, վերջապես, MDC 9661-ի համակեցությունը INR-2010-Tsov-G-St շտամի հետ ոչ մի ակտիվություն չի ցուցաբերել *A. flavus*-ի նկատմամբ: Ուսումնասիրված ԿԹԲ համակեցություններից միայն MDC 9661-ի և VKPM B-3386-ի խառնուրդն է կարողացել ճնշել *A. flavus*-ի աճը:

3.4 ԿԹԲ շտամների հավանական անտագոնիզմի ուսումնասիրությունը

Ուսումնասիրվել է ԿԹԲ շտամների հավանական անտագոնիզմը: Արդյունքում պարզ դարձավ, որ գրեթե բոլոր փորձարկված շտամները միմյանց նկատմամբ դրսևորում են որոշակի արգելակիչ ակտիվություն: Սակայն հետաքրքիր է նշել, որ ոչ մի ԿԹԲ շտամի կողմից չի ճնշվել *L. rhamnosus* MDC 9661-ի աճը, մինչդեռ վերջինս զգալիորեն ճնշել է հետազոտված ԿԹԲ շտամների մեծամասնության աճը (միջինում՝ $13 \pm 0,4$ մմ աճի բացակայության գոտիով):

3.5 ԿԹԲ համակեցությունների հակաբակտերիային ակտիվության ուսումնասիրությունը

ԿԹԲ 21 համակեցությունների հակաբակտերիային ակտիվության ուսումնասիրության արդյունքում ի հայտ եկան էական փոփոխություններ՝ կախված սննդամիջավայրից և աճեցման պայմաններից: Որոշ ԿԹԲ համակեցություններ դրսևորել են զգալի հակաբակտերիային ակտիվություն *E. coli*-ի, *B. mesentericus*-ի, *S. typhimurium*-ի, *P. aeruginosa*-ի և *S. aureus*-ի նկատմամբ՝ ՄՈՇ արգանակում, շտամների համատեղ աճեցման դեպքում (37°C , 24ժ) (Նկ. 3):

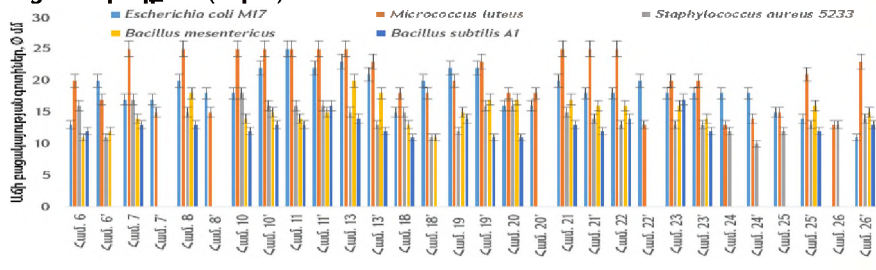


Նկ. 3. ԿԹԲ համակեցությունների հակաբակտերիային ակտիվությունը ՄՈՇ արգանակում համատեղ աճեցմամբ

(համակեցություններում ընդգրկված շտամներն աճեցվել են միևնույն ժամանակահատվածում)

ԿԹԲ շտամների՝ ժամանակային առումով տարանջատված աճեցման դեպքում հակաբակտերիային ակտիվություն դիտվել է միայն *M. luteus*-ի և *B. mesentericus*-ի նկատմամբ՝ միջինում $27 \pm 0,4$ մմ աճի բացակայության գոտիով: ԿԹԲ համակեցությունների մեծամասնության արգելակիչ ակտիվության կտրուկ ուժգնացում դիտվել է կաթում՝ *E. coli*-ի, *S. aureus*-ի և *B.*

mesentericus-ի նկատմամբ՝ ժամանակային առումով տարանջատված աճեցման դեպքում (Նկ. 4):



Նկ. 4. ԿԹԲ համակեցությունների հակաբակտերիային ակտիվությունը կաթում՝ ժամանակային առումով տարանջատված աճեցմամբ (համակեցություններում ընդգրկված շտամներն աճեցվել են տարբեր ժամանակահատվածներում)

3.6 ԿԹԲ-ով ստացված կազեինային հիդրոլիզատների հակաբակտերիային ակտիվության ուսումնասիրությունը

Հիմք ընդունելով, որ ԿԹԲ համակեցությունների դրսևորած բարձր հակաբակտերիային ակտիվությունը պայմանավորված է կաթի բաղադրիչներով, ուսումնասիրվել է կազեինային հիդրոլիզատների՝ նատրիումի կազեինատի և β -կազեինի հակաբակտերիային ակտիվությունը (Նկ. 5):



Նկ. 5. ԿԹԲ քիչների և նատրիումի կազեինատի համակցված խառնուրդի չոր զանգվածի հակաբակտերիային ակտիվությունը

Lr – *L. rhamnosus* MDC 9661, Ls – *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RIN-2003-Ls, 4.2 – *L. delbrueckii* subsp. *lactis* MDC 9632, 5.2 – *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* MDC 9633, StB – *S. thermophilus* VKPM B-3386, Ed – *E. durans*, B7 – *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B7, K – ստուգիչ

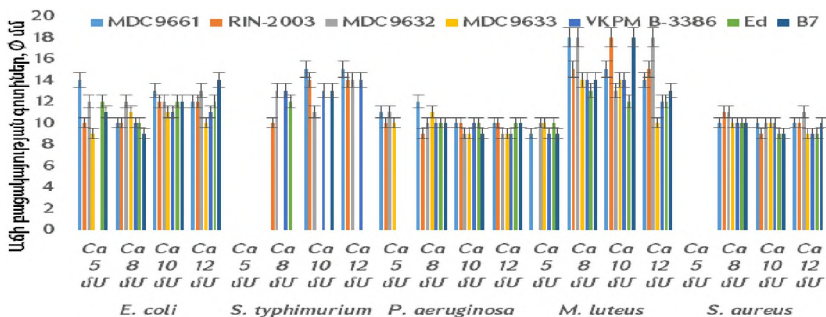
MDC 9632 և MDC 9633 շտամներով նատրիումի կազեինատի՝ կենտրոնախումամբ տարանջատված հիդրոլիզատների՝ վակուումային չորացման եղանակով ստացված զանգվածները, համապատասխանաբար, 12 և 14 մգ մաքուր կշռով, ցուցաբերում են զգալի արգելակիչ ակտիվություն *E. coli*-ի ($15,0 \pm 0,4$ մմ) և *S. aureus*-ի ($13,0 \pm 0,5$ մմ) նկատմամբ, իսկ B7 շտամի հետ համակցված նատրիումի կազեինատի հիդրոլիզատի չոր զանգվածը՝ 40 մգ մաքուր կշռով, *E. coli*-ի նկատմամբ ($15,0 \pm 0,4$ մմ):

Հատկանշական է, որ փորձարկված ԿԹԲ շտամներից միայն MDC 9632-ի և MDC 9633-ի հիդրոլիզատներն են կարողացել ճնշել *E. coli*-ի և *S.*

aureus-ի աճը, ինչը, ամենայն հավանականությամբ, կապված է դրանց բարձր պրոտեոլիտիկ ակտիվության հետ (Keryan et al 2016):

3.7 Մետաղական իոնների ազդեցությունը ԿԹԲ շտամների և դրանց համակեցությունների հակաբակտերիային ակտիվության վրա

Ուսումնասիրվել է Ca և Mg իոնների տարբեր կոնցենտրացիաների ազդեցությունը ԿԹԲ շտամների և դրանց համակեցությունների հակաբակտերիային ակտիվության վրա: Պարզվեց, որ ԿԹԲ շտամների հակաբակտերիային ակտիվության ուժգնությունը կախված է իոնների կոնցենտրացիայից: Մասնավորապես, ԿԹԲ շտամների մեծամասնությունը ցուցաբերում է զգալի արգելակիչ ակտիվություն *E. coli*-ի և *M. luteus*-ի նկատմամբ՝ աճեցման սննդամիջավայրին 10 մՄ Ca^{2+} ավելացնելիս, մինչդեռ MDC 9632-ը և MDC 9633-ն իրենց լավագույն ակտիվությունը դրսևորում են Ca^{2+} -ի, համապատասխանաբար, 12 և 8 մՄ կոնցենտրացիաների դեպքում (Նկ. 6):

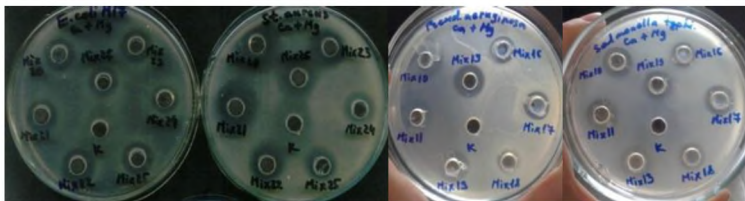
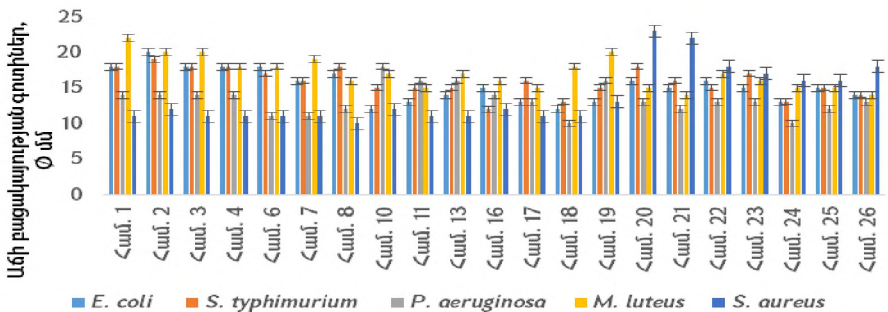


Նկ. 6. Ca^{2+} -ի տարբեր կոնցենտրացիաների ազդեցությունը ԿԹԲ շտամների հակաբակտերիային ակտիվության վրա

MDC 9661-ը, RIN-2003-ը և *E. durans*-ը իրենց ամենաբարձր արգելակիչ ակտիվությունը դրսևորում են *E. coli*-ի, *S. typhimurium*-ի, *M. luteus*-ի և *S. aureus*-ի նկատմամբ՝ Mg^{2+} -ի 10 մՄ կոնցենտրացիայի դեպքում: MDC 9632-ի, MDC 9633-ի և B7-ի հակաբակտերիային ակտիվության համար Mg^{2+} -ի նախընտրելի կոնցենտրացիան 12 մՄ է, իսկ VKPM B-3386-ի համար՝ 8 մՄ: Հետաքրքիր է, որ 12 մՄ Mg^{2+} -ի ավելացումը խթանում է MDC 9633-ի և B7-ի հակաբակտերիային ակտիվությունը նույնիսկ ախտածին *P. aeruginosa*-ի նկատմամբ:

ԿԹԲ համակեցությունների մեծամասնությունը դրսևորում է զգալի արգելակիչ ակտիվություն *M. luteus*-ի, *S. typhimurium*-ի և *E. coli*-ի նկատմամբ Ca^{2+} -ի տարբեր կոնցենտրացիաների դեպքում, իսկ որոշ համակեցություններ ճնշում են ախտածին *P. aeruginosa*-ի և *S. aureus*-ի աճը՝ ժամանակային

առումով տարանջատված աճեցման դեպքում: Հետաքրքիր է, որ ԿԹԲ տարանջատված աճեցման դեպքում սննդամիջավայրում Mg իոնների առկայության պայմաններում դիտվել է համակեցությունների արգելակիչ ակտիվության մասնակի կորուստ, մինչդեռ իոնների խառնուրդի դիտվել է արգելակիչ ակտիվության նշանակալի բարձրացում: Ընդհակառակը, համատեղ աճեցման դեպքում բազմաթիվ ԿԹԲ համակեցությունների հակաբակտերիային ակտիվությունը զգալիորեն խթանվել է Mg^{2+} -ի տարբեր կոնցենտրացիաներով: Թեստ-օրգանիզմների աճի բացակայության ամենամեծ գոտիների առաջացմամբ պայմանավորված ամենաբարձր հակաբակտերիային ակտիվությունը դիտվում է Ca և Mg իոնների համակցված խառնուրդի ավելացման դեպքում (Նկ. 7):



Նկ. 7. Ca^{2+} -ի և Mg^{2+} -ի համակցված խառնուրդի ազդեցությունը ԿԹԲ համակեցությունների հակաբակտերիային ակտիվության վրա (համատեղ աճեցում)

Mix 10-19 – Համակեցություններ 10-19, Mix 20-26 – Համակեցություններ 20-26, K – ստուգիչ

3.8 Ca և Mg իոնների ազդեցությունը ԿԹԲ շտամների և դրանց համակեցությունների հակասնկային ակտիվության վրա

Ուսումնասիրվել է Ca և Mg իոնների ազդեցությունը ԿԹԲ շտամների և դրանց համակեցությունների հակասնկային ակտիվության վրա: Պարզվեց, որ ԿԹԲ աճեցման սննդամիջավայրին մետաղական իոնների ավելացման դեպքում դիտվում է ինչպես հակասնկային ակտիվության խթանում, այնպես էլ արգելակում: MDC 9661-ը կորցնում է իր արգելակիչ ակտիվությունը *M. plumbeus*, *P. aurantioviolaceum*, *T. viride* և *G. candidum* սնկերի նկատմամբ,

մինչդեռ առանց Ca^{2+} -ի հավելման դրսևորում է հակասնկային ակտիվություն գրեթե բոլոր բորբոսասնկերի նկատմամբ: Ca իոնների ավելացումը խթանել է RIN-2003-Ls-ի, MDC 9632-ի և MDC 9633-ի արգելակիչ ակտիվությունը բոլոր բորբոսասնկերի նկատմամբ, մինչդեռ առանց Ca^{2+} -ի նշված շտամները ճնշել են միայն *F. oxysporum*-ի և *Cl. herbarum*-ի աճը (Աղ. 1): Mg իոնները ճնշում են MDC 9661-ի հակասնկային ակտիվությունը *M. plumbeus*, *P. aurantio-violaceum*, *T. viride* և *G. candidum* սնկերի նկատմամբ, իսկ INR-2010-Tsov-G-St-ի և VKPM B-3386-ի հակասնկային ակտիվությունը ճնշվել է ամբողջովին: Mg իոնների հավելումը ամբողջությամբ խթանել է RIN-2003-Ls-ի հակասնկային ակտիվությունը: Ca իոնների ավելացումը զգալիորեն խթանել է ԿԹԲ որոշ համակեցությունների հակասնկային ակտիվությունը (Աղ. 3):

Աղ. 3. Ca իոնների ազդեցությունը ԿԹԲ համակեցությունների հակասնկային ակտիվության վրա

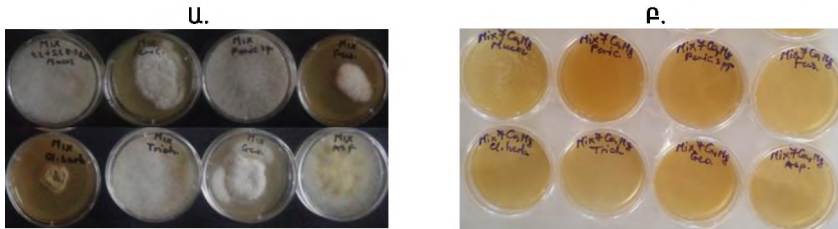
Սունկ № ԿԹԲ համակեցություն	<i>Mucor plumbeus</i>	<i>Penicillium aurantio-violaceum</i>	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Cladosporium herbarum</i>	<i>Trichoderma viride</i>	<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
1	-	-	-	+	-	-	-	+/-
2	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	-	+	+	+	+	+	+
5	-	-	-	+	-	-	-	+/-
6	-	+	+	+	+	+	+	+
7	-	+	+	+	-	-	-	+
8	-	-	+	+	+/-	-	-	+
9	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	+	+	+	+/-	+	+
11	-	+	+	+	+	-	-	+
12	+	+	+	+	+	-	-	-
13	-	-	+	+	-	-	-	-
14	-	-	-	+	-	-	-	-
15	-	+	+	+	-	-	-	+/-

(+) – հակասնկային ակտիվության առկայություն $/10^4$ սնկերի սպորների աճի արգելակում,

(-) – հակասնկային ակտիվության բացակայություն, (+/-) – սպորառաջացման երկարաձգում

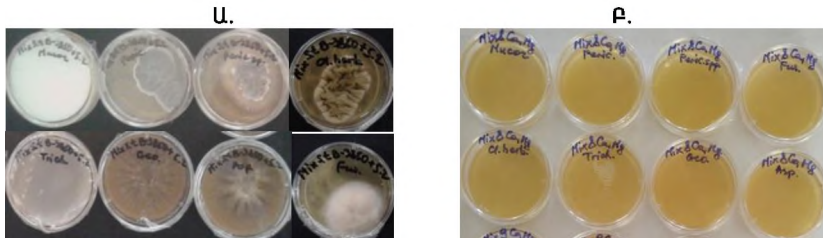
Եթե ԿԹԲ բնական համակեցությունների մեծամասնությունը (Համ. № 6-15) դրսևորում է արգելակիչ ակտիվություն միայն *F. oxysporum*-ի և *Cl. herbarum*-ի նկատմամբ, ապա Ca իոնների հավելմամբ որոշ համակեցություններում ճնշվել է նաև *P. aurantio-violaceum*, *Penicillium sp.*, *T. viride*, *G. candidum* և *A. flavus* բորբոսասնկերի աճը: Հետաքրքիր է նշել, որ RIN-2003-Ls, MDC 9632, MDC 9633 և INR-2010-Tsov-G-St շտամներից կազմված համակեցությունները առանց մետաղական իոնների հավելման գրեթե չեն դրսևորել արգելակիչ ակտիվություն՝ երկարաձգելով միայն *Cl.*

herbarum-ի անը, մինչդեռ Mg իոնների ավելացումը ճնշել է գրեթե բոլոր բորբոսասնկերի անը: ԿԹԲ համակեցությունների մեծամասնության (Համ. № 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10-15) հակասնկային ակտիվությունը առավելապես խթանվել է սննդամիջավայրին Ca և Mg իոնների համակցված խառնուրդի ավելացումից հետո: Հատկանշական է, որ VKPM B-3386, MDC 9632 և MDC 9633 շտամների տարբեր համակեցությունները բնական պայմաններում չեն դրսևորել հակասնկային ակտիվություն ոչ մի փորձարկված բորբոսասնկի նկատմամբ, մինչդեռ Ca և Mg իոնների ավելացումը ամբողջովին խթանել է այդ համակեցությունների հակասնկային ակտիվությունը (Նկ. 8, 9):



Նկ. 8. *S. thermophilus* VKPM B-3386-ի և *L. delbrueckii* subsp. *lactis* MDC 9632-ի համակեցության հակասնկային ակտիվությունը

Ա. Առանց մետաղական իոնների հավելման, Բ. Ca և Mg իոնների համակցված խառնուրդի հավելմամբ



Նկ. 9. *S. thermophilus* VKPM B-3386-ի և *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* MDC 9633-ի համակեցության հակասնկային ակտիվությունը

Ա. Առանց մետաղական իոնների հավելման, Բ. Ca և Mg իոնների համակցված խառնուրդի հավելմամբ

Այսպիսով, մետաղական իոնների խթանիչ ազդեցությունը, հավանաբար, կարող է պայմանավորված լինել մի շարք հանգամանքներով. մետաղական իոնները ԿԹԲ շտամների աճման ընթացքում մեծացնում են վերջիններիս կողմից հակասնկային նյութի/երի սինթեզի և արտազատման արագությունը, կոնցենտրացիան, հակասնկային նյութի/երի հետ-տրանսլյացիոն ձևափոխության արդյունքում ընդգրկվում են մոլեկուլի կազմում՝ դրանով ակտիվացնելով միացությունը/ները կամ խթանում են նախանյութի սինթեզը: Ելնելով ստացված տվյալներից, որ համակեցություններում հակասնկային ակտիվությունը դրսևորվում է նաև այլ

տեսակի սնկերի նկատմամբ, թույլ է տալիս ենթադրել, որ համակեցությունում առկա ԿԹԲ շտամները համատեղ սկսում են *de novo* սինթեզել նոր միացություն/ներ:

ԵԶՐԱԿԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

1. Ամենաբարձր հակասնկային ակտիվություն դրսևորել է *L. rhamnosus* MDC 9661 շտամը, հաստատվել են հակասնկային նյութի/երի բարձր ջերմազգայունությունը (50°C) և կայունությունը pH-ի արժեքների լայն տիրույթում (pH 3-10), սպիտակուցային բնույթը և կապվածությունը բջջապատի հետ:
2. Անտագոնիստական փոխհարաբերություններ հիմնականում դիտվել են *L. rhamnosus* MDC 9661 շտամով կազմված համակեցություններում:
3. *L. rhamnosus* MDC 9661 շտամը այլ ԿԹԲ շտամների հետ համակեցություններում կորցրել է իր հակասնկային ակտիվությունը փորձարկված 8 բորբոսասնկերից 5-ի նկատմամբ:
4. ԿԹԲ համակեցությունների մեծամասնությունը դրսևորել է բարձր հակաբակտերիային ակտիվություն ՄՈՇ-արգանակում՝ շտամների համատեղ աճեցման և կաթում՝ ժամանակային առումով տարանջատված աճեցման դեպքում:
5. *L. delbrueckii* subsp. *lactis* MDC 9632, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* MDC 9633 և *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B7 շտամներով նատրիումի կազեինատի հիդրոլիզատների վերնստվածքային հեղուկների՝ վակուումային չորացման եղանակով ստացված զանգվածները ցուցաբերել են զգալի արգելակիչ ակտիվություն *E. coli* VKPM-M17 և *S. aureus* MDC 5233 թեստ-օրգանիզմների նկատմամբ՝ 12, 14 և 40 մգ մաքուր կշռով, համապատասխանաբար:
6. Ca և Mg իոնները և հատկապես դրանց համակցված խառնուրդը դրսևորում են ամենաբարձր խթանիչ ազդեցությունը ԿԹԲ համակեցությունների հակաբակտերիային ակտիվության վրա՝ շտամների համատեղ աճեցման դեպքում:
7. ԿԹԲ համակեցությունների հակասնկային ակտիվությունը առավելապես խթանվել է Ca և Mg իոնների համակցված խառնուրդի ազդեցության դեպքում:
8. ԿԹԲ շտամների և դրանց համակեցությունների հակամանրէային ակտիվության դրսևորման համար Ca և Mg իոնների օպտիմալ կոնցենտրացիան միջինում կազմել է 10-11 մՄ:

Ատենախոսության թեմայով հրատարակված գիտական աշխատանքների
ցանկ

1. Bazukyan I.L., Matevosyan L.A., "Antifungal activity of lactic acid bacteria isolated from Armenian dairy products", 2014, FEBS Journal 281 (Suppl.1) 65-783, p. 651.
2. Matevosyan L.A., Bazukyan I.L., Trchounian A.H. "Antifungal activity of *Lactobacillus rhamnosus* R-2002 isolated from Armenian dairy products: antifungal component, its probable nature and purification", 2015, Book of abstracts "Dialogues on science" III International Scientific Conference of Young Researchers, June 23-26, Yerevan, Armenia, p. 20.
3. Matevosyan L.A., Bazukyan I.L., Trchounian A.H. "Antimicrobial activity of newly created associations vs. separate species of lactic acid bacteria", 2017, Book of abstracts "Biotechnology: Science and Practice" IV International Scientific Conference of Young Researchers, September 28-30, Yerevan, Armenia, pp. 5-6.
4. Bazukyan I.L., Matevosyan L.A., Toplaghalsyan A.G., Trchounian A.H. "Antifungal activity of lactobacilli isolated from Armenian dairy products: an effective strain and its probable nature", 2018, AMB Express 8:87, <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0619-y>.
5. Matevosyan L.A., Bazukyan I.L., Trchounian A.H. "Comparative analysis of the effect of Ca and Mg ions on antibacterial activity of lactic acid bacteria isolates and their associations depending on cultivation conditions", 2019, AMB Express 9:32, <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0758-9>.
6. Matevosyan L.A., Bazukyan I.L., Trchounian A.H. "Effect of Ca and Mg ions on antimicrobial activity of lactic acid bacteria communities", 2019, Book of abstracts "Current advances in pathogen research" FEBS Advanced lecture course, March 25-30, Yerevan, Armenia, p. 33.
7. Matevosyan L.A. "Effect of Ca and Mg ions on the growth and antibacterial activity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RIN-2003-LS", 2019, Biological Journal of Armenia, 1 (71), pp 6-11.
8. Matevosyan L.A., Bazukyan I.L., Trchounian A.H. "Antifungal and antibacterial effects of newly created lactic acid bacteria associations depending on cultivation media and duration of cultivation", 2019, BMC Microbiology 19:102, <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1475-x>.
9. Matevosyan L.A., Bazukyan I.L., Trchounian A.H. "Estimation of the effects of Ca and Mg ions on antifungal activity of lactic acid bacteria associations", 2019, Book of abstracts "Microbes: Biology & Application", International Conference "Microbes: Biology & Application", October 9-11, Yerevan, Armenia, pp. 12-13.

ПРОТИВОМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ АССОЦИАЦИЙ
МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

РЕЗЮМЕ

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, ассоциации МКБ, антигрибковая активность, антибактериальная активность, ионы Ca и Mg.

Молочнокислые бактерии (МКБ) использовались в домашнем хозяйстве с давних времен для производства и хранения пищевых продуктов. Испокон веков человечество производило и использовало молочные продукты не только как неотъемлемую часть пищевого рациона, но и как лечебное средство благодаря их высокой противомикробной активности. С точки зрения биоконсервации важно изучать не только естественные ассоциации МКБ в молочных продуктах, но и создать новые и эффективные ассоциации МКБ для получения биопрепаратов с высокой противомикробной активностью.

С этой целью были созданы различные ассоциации МКБ из штаммов с высокой противомикробной активностью. Изучены их биологические свойства и выбраны более эффективные ассоциации, обладающие одновременно высокой антибактериальной и антигрибковой активностью.

Исследуемые штаммы МКБ выделены из традиционных молочных продуктов разных регионов Армении, а также из желудочно-кишечного тракта медоносных пчел и идентифицированы согласно культуральным, морфофизиологическим, биохимическим особенностям, а также методом анализа гена 16S rPHK как *Lactobacillus rhamnosus* MDC 9661, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* MDC 9632, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* MDC 9633, *Streptococcus thermophilus* VKPM B-3386, *Enterococcus durans* (Ed), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B7, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (RIN-2003-Ls) и *Enterococcus faecium* INR-2010-Tsov-G-St.

Упомянутые штаммы обладают высокой противомикробной активностью по отношению грамположительным и грамотрицательным бактериям, а также дрожжевым и плесневым грибам. Большинство штаммов МКБ показали более высокую антибактериальную активность в молоке против 5-и тест-организмов по сравнению с MPC бульоном. Наибольшие зоны задержки роста наблюдаются у *Salmonella typhimurium*, *Micrococcus luteus* и *Staphylococcus aureus*. С другой стороны, штаммы VKPM B-3386, Ed и B7 показали более высокую активность против некоторых тест-организмов в MPC бульоне. Самая высокая антигрибковая активность наблюдается у штамма MDC 9661, который подавляет рост почти всех исследуемых грибов.

Показаны высокая pH-устойчивость и термочувствительность антигрибковой активности штамма MDC 9661, фунгицидный эффект, а также возможная связь антигрибкового компонента/ов с клеточной стенкой. Определена белковая природа антигрибкового компонента/ов, а также проведены эксперименты для его выделения.

Изучена антигрибковая активность 15-и ассоциаций МКБ, в результате чего было показано, что MDC 9661 частично теряет свою антигрибковую активность в ассоциациях с другими штаммами из-за предполагаемого возможного антагонизма и конкуренции между ними.

В результате изучения антибактериальной активности 21 различной ассоциации МКБ впервые было показано, что более интенсивная антибактериальная активность проявляется в МРС бульне при совместном культивировании штаммов, а в молоке – при культивировании, разделенного по времени.

Было показано, что ионы Ca и Mg стимулируют противомикробную активность изолятов и ассоциаций МКБ. Оптимальная стимулирующая концентрация в среднем составляет 10 ммоль для кальция и 11 ммоль для магния. Ионы Ca и Mg, и, в частности, их комбинированная смесь резко увеличивают антибактериальную активность ассоциаций МКБ при совместном культивировании изолятов. Интересно отметить, что некоторые ассоциации МКБ приобрели способность подавлять рост всех исследуемых плесневых грибов после добавления в питательную среду смеси ионов, тогда как без добавления ионов не обладали никакой активностью.

В результате исследований выбраны 4 самые эффективные ассоциации МКБ, которые одновременно обладают высокой антибактериальной и антигрибковой активностью. Эти ассоциации представляют собой различные комбинации штаммов MDC 9661, RIN-2003-Ls, MDC 9632, MDC 9633 и VKPM B-3386, и могут применяться как биоконсерванты в пищевой промышленности, а также с целью получения натуральных противомикробных препаратов. Для повышения противомикробного эффекта ассоциаций предлагается применять комбинированную смесь ионов Ca и Mg с концентрацией 10-12 ммоль.

MATEVOSYAN LUSINE A.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF VARIOUS LACTIC ACID BACTERIA ASSOCIATIONS

SUMMARY

Key words: lactic acid bacteria, LAB associations, antibacterial activity, antifungal activity, Ca and Mg ions.

Lactic acid bacteria (LAB) have been used in the household since ancient times for production and preservation of food products. From time immemorial, mankind has produced and used dairy products not only as an integral part of the diet, but also as a therapeutic agent due to their high antimicrobial activity. From the point of view of bioconservation, it is important to study not only the natural associations of LAB in dairy products, but also to create new and effective LAB associations to obtain biological preparations with high antimicrobial activity.

For this purpose, various associations of LAB from strains with high antimicrobial activity were created. Their biological properties were studied and more effective associations with both high antibacterial and antifungal activity were selected.

The studied LAB strains are isolated from traditional dairy products from different regions of Armenia, as well as from the gastrointestinal tract of honeybees and identified according to cultural, morphophysiological, biochemical characteristics, as well as by the method of analysis of the 16S rRNA gene as *Lactobacillus rhamnosus* MDC 9661, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* MDC 9632, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* MDC 9633, *Streptococcus thermophilus* VKPM B-3386, *Enterococcus durans* (Ed), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B7, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (RIN-2003-Ls) and *Enterococcus faecium* INR-2010-Tsov-G-St.

Mentioned strains have high antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria, as well as yeasts and molds. Most LAB strains revealed a higher antibacterial activity in milk against 5 test-organisms compared with MRS-broth. The biggest zones of growth inhibition are observed in *Salmonella typhimurium*, *Micrococcus luteus* and *Staphylococcus aureus*. On the other hand, the strains VKPM B-3386, Ed and B7 showed the higher activity against some test-organisms in MRS-broth. The highest antifungal activity is observed in strain MDC 9661, which inhibits the growth of almost all of the studied fungi. High pH stability and heat sensitivity of the antifungal activity of MDC 9661 strain, fungicidal effect, as well as the possible association of the antifungal component/s with the cell wall are shown. The protein nature of the antifungal component/s was determined, and experiments were conducted to isolate it.

The antifungal activity of 15 LAB associations was studied, as a result of which it was shown that MDC 9661 partially loses its antifungal activity in associations with other strains due to the possible antagonism and competition between them.

As a result of studying the antibacterial activity of 21 different LAB associations, it was shown for the first time that more intense antibacterial activity is manifested in MRS broth in case of joint cultivation of strains, and in milk during time-spaced cultivation.

It was shown that Ca and Mg ions stimulate the antimicrobial activity of LAB isolates and associations. The optimal stimulating concentration averages 10 mmol for calcium and 11 mmol for magnesium. The Ca and Mg ions, and, in particular, their combined mixture sharply increase the antibacterial activity of the LAB associations during the joint cultivation of isolates. It is interesting to note that some LAB associations have acquired the ability to inhibit the growth of all studied molds after addition of ions mixture to the nutrient medium, while without ions addition they did not show any activity.

As a result of the studies, 4 of the most effective LAB associations were selected, which simultaneously have high antibacterial and antifungal activity. These associations are various combinations of strains MDC 9661, RIN-2003-Ls, MDC 9632, MDC 9633 and VKPM B-3386 and can be used as biopreservatives in the food industry, as well as for the purpose of producing natural antimicrobial agents. To increase the antimicrobial effect of associations, it is proposed to use a combined mixture of Ca and Mg ions with a concentration of 10-12 mmol.