ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი

ირაკლი ჯანაშია

ზუსტ და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტეტი

ბიოლოგიის დეპარტამენტი; მიმართულება: იმუნოლოგია, მიკრობიოლოგია

მეთაფლე ფუტკრის - *Apis mellifera* - რძემჟავა ბაქტერიული მიკროფლორის პრობიოტიკური პოტენციალის შესწავლა

სადოქტორო დისერტაცია

ხელმძღვანელები:

სადოქტორო პროგრამის ხელმძღვანელი:
თსუ სრული პროფესორი
ბიოლ. მეცნ. დოქტორი ნინო ფორაქიშვილი

სამეცნიერო ხელმძღვანელები:
ბიოლ. მეცნ. დოქტორი ნინა ჭანიშვილი
ბიოლ. მეცნ. დოქტორი ნინო ფორაქიშვილი

თბილისი 2017 წელი

Ivane Javakhishvili Tbilisi State University

Irakli Janashia

Faculty of Exact and Natural Sciences, Department of Biology

Study of the Probiotic Potential of Honeybee – *Apis mellifera* Bacterial Lactic Microflora

Doctoral Dissertation

Head of Doctoral Program:
Professor, Nino Porakishvili

Research Directors:

Nina Chanishvili, Ph.D

Nino Porakishvili, Ph.D

Tbilisi 2017

სადისერტაციო ნაშრომი შესრულებულია:

გ.ელიავას სახელობის ბაქტერიოფაგიის, მიკრობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტის, საფრანგეთის აგრონომიული კვლევის ეროვნული ინსტიტუტისა და იტალიის აგრარული კონსორციუმის კვლევითი ცენტრების ბაზებზე.

განაცხადი

როგორც წარმოდგენილი სადისერტაციო ნაშრომის ავტორი, ვაცხადებ, რომ მოცემული დისერტაცია წარმოადგენს ჩემს ორიგინალურ ნამუშევარს და არ შეიცავს სხვა ავტორების მიერ აქამდე გამოქვეყნებულ, გამოსაქვეყნებლად მიღებულ ან დისერტაციის დასაცავად წარდგენილ მასალებს, რომლებიც ნაშრომში არ არის ციტირებული სათანადო წესების დაცვით.

ანოტაცია

მეთაფლე ფუტკრის - *Apis mellifera*, როგორც დამმტვერავის, უნიკალური როლი ეკოსისტემისა და სოფლის მეურნეობისთვის შეუფასებელია. ბოლო დროს მსოფლიო მასშტაბით ფუტკრის პოპულაციების მკვეთრი კლება აღინიშნება, რაც მზარდი სტრესფაქტორებით შეიძლება აიხსნას. მათი კომპლექსური მოქმედება, მეცნიერთა აზრით, მეთაფლე ფუტკრების იმუნური სისტემის დათრგუნვას იწვევს, რაც მრავალი ტიპის პათოგენური მიკროორგანიზმის თუ მავნებლის მიმართ მათ მოწყვლადობას განაპირობებს. ამიტომ, ფუტკრის პოპულაციების დაცვის თანამედროვე სტრატეგია მათი იმუნური სისტემის მობილიზაციაზეა ფოკუსირებული. *Apis mellifera*–ს კოლონიის სიმბიოტური მიკრობული შემადგენლობა იმუნური სისტემის ნაწილია. მიიჩნევა, რომ მიკრობიოტით მანიპულირება იმუნური სისტემის მდგომარეობის მართვის საშუალებას უნდა იძლეოდეს.

წარმოდგენილი კვლევა, მეთაფლე ფუტკრების ფრუქტოფილური რძემჟავა ბაქტერიების პრობიოტიკური პოტენციალის გამოსავლენად, მათი ბიომრავალფეროვნებისა და ბიოქიმიური თავისებურებების შესწავლას გულისხმობდა.

მეთაფლე ფუტკრის კოლონიებიდან ჩვენ მიერ გამოყოფილი 86 რძემჟავა ბაქტერიის შტამის კვლევამ, მათი სახეობის დონეზე იდენტიფიკაციამ, ცალკეული შტამის პრობიოტიკური პოტენციალის და ბიოქიმიური თავისებურებების შესწავლამ, მრავალფეროვანი ფენოტიპების აღმოჩენის საშუალება მოგვცა. კერძოდ, აღმოჩნდა, რომ ჩვენ მიერ ფუტკრის კოლონიიდან გამოყოფილი ენდოგენური რძემჟავა ბაქტერიების ნაწილს ანტიფუნგური და იმუნომოდულატორული თვისებები გააჩნია, რაც მათ პრობიოტიკულ პოტენციალზე მიანიშნებს. ასევე საყურადღებოა ენდოგენური ბაქტერიების მკვეთრად გამოხატული მანოზასპეციფიური ადჰეზიის თვისება, რაც სპეციფიურ საარსებო გარემოსთან მათ ადაპტაციასა და პათოგენებთან ამ ნიშის დაკავების დროს კონკურენციისას გამოყენებულ შესაძლო მექანიზმზე მიუთითებს.

ჩვენ მიერ შერჩეული ბატქერიული შტამების კვლევის მრავალწახნაგოვანი მიდგომის შედეგად უნიკალური ენდოგენური ბაქტერიული რესურსი იქნა მოპოვებული, რომლის პრაქტიკული გამოყენებაც მომავალში ახალ პერსპექტივებს სახავს.

Abstract

Honeybee - *Apis mellifera* provides inestimable pollination services to agriculture and ecosystem, however, nowadays pollinators' population are in decline. Honeybees are facing with growing stress factors, which are weakening the immune system of insects, therefore making them susceptible to various pests and pathogens. A modern strategy of honeybee protection relies on the immune system strengthening approach. Microbial symbionts of *Apis mellifera* colony are regarded as an extended part of immune system. The management of microbiota is likely to allow us to influence on their immune system.

The presented study has been aiming the investigation of microbial diversity of honeybee endogenous lactic acid bacteria and reveal of their host-beneficial biochemical properties. This will help us to understand the better host-microbiota symbiotic interactions, and to apply that phenomenon of symbiosis in practical beekeeping.

We had isolated 86 LAB strains from the honeybee colonies located in different regions of Georgia. The study of biochemical properties of the isolates demonstrates their probiotic potential. It has appeared that a part of isolates possess antifungal and imunomodulatory activities, which indicates their probiotic potential. The discovery of mannose specific adhesive properties among majority of isolates provides some new insights on plausible microbial competition mechanisms taking place during the colonization of honeybee intestine. This also sheds light on the effective adaptation of microbiota to specific ecological niche.

Honeybee endogenous bacterial strains, obtained through this complex study, represent the considerable source for designing potential probiotic formulations and their further use in apicultural manipulations.

სარჩევი

თავფურცელი	1
ანოტაცია	3
შემოკლებები და აბრევიატურა	8
ტერმინთა განმარტება	8
თეზისის სტრუქტურა	9
<u>თავი 1. შესავალი</u>	10
1.1 კვლევის სფეროს მოკლე მიმოხილვა	10
1.2 კვლევის მიზანი და ამოცანები	13
<u>თავი 2. ლიტერატურის მიმოხილვა</u>	15
2.1 *Apis mellifera* –ს ეკოსისტემა, ბიოტური და აბიოტური ფაქტორები	15
2.2 მეთაფლე ფუტკრისთვის დამახასიათებელი მიკრობული სამყარო: სიმბიოზი, კომენსალიზმი, პარაზიტიზმი	16
ა) ნაწლავური მიკროფლორა	20
ბ) ჭეოს მიკრობული შემადგენლობა	23
გ) *Apis mellifera* – ს პათოგენური მიკროორგანიზმები	25
2.3 *Apis mellifera* –ს იმუნური სისტემის თავისებურებანი	28
2.4 მიკრობულ დაავადებათა კონტროლის კონვენციური მიდგომა და მისი ნაკლოვანებები	31
2.5 მიკრობული რესურს-მენეჯმენტი -მეთაფლე ფუტკრის ეკოსისტემის გაჯანსაღების პერსპექტიული მიმართულება	34
<u>თავი 3. ჰიპოთეზები და კვლევის მეთოდური მიდგომის შერჩევა</u>	38
<u>თავი 4. მასალები და მეთოდები</u>	42
4.1 ფრუქტოფილური რძემჟავა ბაქტერიების გამოყოფა ფუტკრის კოლონიიდან	42
4.2 სოკოვანი მიკროორგანიზმების გამოყოფა ჭეოდან	42
4.3 გამოყოფილი ბაქტერიების იდენტიფიკაცია	43
4.4 გამოყოფილი სოკოების იდენტიფიკაცია	44
4.5 ბაქტერიების პრობიოტიკური თვისებების განმაპირობებელი ბიოქიმიური თვისებების შესწავლა	45
4.5.1 ადჰეზიური თვისებების განსაზღვრა *in vitro* მოდელების გამოყენებით	45
4.5.2 ანტიბაქტერიული თვისებების განსაზღვრა (სკრინინგი ბაქტერიოცინოგენურობაზე)	48
4.5.3 ჭეოს ფერმენტაციის სიმულირება და რძემჟავა ბაქტერიების ფუნგიციდური, პოტენციალის შესწავლა	49
4.5.4 ბაქტერიების პროტეოლიზური აქტივობის განსაზღვრა ულტრაგაცხელებით სტერილიზებულ უცხიმო რძეში	51
4.5.5 ბაქტერიების პროტეოლიზური აქტივობის განსაზღვრა ყვავილის	52

მტვრის სუბსტრატში
4.5.6. ამილოლიზური აქტივობის განსაზღვრა 52
4.6 ანტიბიოტიკების მიმართ მგრძნობელობის და მინიმალური ინჰიბიტორული კონცენტრაცის განსაზღვრა 53
4.7. *In vivo* ცდები ფუტკრებზე 53
4.7.1 რძემჟავა ბაქტერიების ჩართვა ფუტკრის ლარვების დიეტაში, იმუნომოდულაციური ეფექტის შესწავლა რეალურ დროში (რაოდენობრივი) პჯრ ტექნიკის გამოყენებით 53
4.7.2 ლარვებისა და ჭუპრის სიცოცხლისუნარიანობისა და იმაგო ფორმების გამოჩეკის კონტროლი 56
4.7.3 *In vivo* პირობებში გაზრდილი ფუტკრების ფიზიოლოგიური აქტივობის - ოლფაქტორული მგრძნობელობის ფუნქციური ტესტი 56
4.7.4 კანდიდატი პრობიოტიკური ნარევის ადმინისტრირება პარაზიტ *Nosema ceranae* –ს სპორებით ინფიცირებულ იმაგო ფორმებში და დაავადების მიმდინარეობაზე მისი ეფექტის განსაზღვრა 57
<u>**თავი 5. მიღებული შედეგები**</u> 60
5.1 ბაქტერიული იზოლატების იდენტიფიკაცია 60
5.2 გამოყოფილი სოკოების იდენტიფიცაცია 61
5.3 ბაქტერიების პრობიოტიკური თვისებების განმაპირობებელი ბიოქიმიური თვისებების შესწავლა 64
5.3.1 ბაქტერიული კულტივარების ადჰეზიური თვისებების განსაზღვრა ინ ვიტრო მოდელების გამოყენებით 64
5.3.2 ანტიბაქტერიული თვისებების განსაზღვრა (სკრინინგი ბაქტერიოცინოგენურობაზე 67
5.3.3 ჭეოს ფერმენტაციის სიმულირება და რძემჟავა ბაქტერიების ფუნგიციდური, პოტენციალის შესწავლა 70
5.3.4 ბაქტერიების პროტეოლიზური და ამილოლიზური აქტივობის განსაზღვრა 72
5.3.5 ანტიბიოტიკების მიმართ მგრძნობელობა და მინიმალური ინჰიბიტორული კონცენტრაცის განსაზღვრა 73
5.4 *In vivo* ცდები ფუტკრებზე 75
5.4.1 კანდიდატი პრობიოტიკი შტამების იმუნომოდულაციური ეფექტი 75
5.4.2 ლარვებისა და ჭუპრის სიცოცხლისუნარიანობისა და იმაგო ფორმების გამოჩეკის კონტროლი 76
5.4.3 *in vivo* ცდისას მიღებული იმაგო ფორმების ფიზიოლოგიური აქტივობის – ოლფაქტორული მგრძნობელობის ტესტი 77
5.4.4 კანდიდატი პრობიოტიკური ნარევის ადმინისტრირება პარაზიტ *Nosema ceranae* –ს სპორებით ინფიცირებულ იმაგო ფორმებში და დაავადების მიმდინარეობაზე მისი ეფექტის განსაზღვრა 79

<u>თავი 6. შედეგების განხილვა</u> 79
6.1 გამოყოფილი ბაქტერიული კულტივარების მრავალფეროვნება და ბიოქიმიური თავისებურებები 79
6.2 ენდოგენური და ეგზოგენური რძემჟავა ბაქტერიების ანტიბაქტერიული
აქტივობა 81
6.3 ჭეოს სოკოვანი მიკროფლორა და ენდოგენური რძემჟავა ბაქტერიების ანტიფუნგური აქტივობა 84
6.4 ენდოგენური რძემჟავა ბაქტერიების ენზიმური აქტივობა 85
6.5 ენდოგენური რძემჟავა ბაქტერიები და იმუნური სისტემის მოდულირება 86
6.6 ნოზემას ინფექცია და პრობიოტიკური ნარევის ეფექტი 88
<u>თავი 7. დასკვნები</u> 89
გამოყენებული ლიტერატურა 90

შემოკლებების სია

CCD - კოლონიების მასიური და სწრაფი დაღუპვის ფენომენი (Colony Collapse Disorder)
MRM – მიკრობული რესურს მენეჯმენტი (Microbial Resource Management)
SBS – ჭეოს სიმულირებული სუბსტრატი (Simulated Beebread Substrate)
SNR – ნექტრის სიმულირებული ხსნარი (Nectar Resambling Solution)
მგ - მილიგრამი
მკგ - მიკროგრამი
მკლ - მიკროლიტრი
მლ - მილილიტრი
ბრ - ბრუნი
წთ - წუთი
სთ - საათი

ტერმინთა განმარტება

კოევოლუცია – ურთიერთკავშირში მყოფი სახეობების ერთდროული ევოლუცია.
მიკრობიოტა – ეუკარიოტული მასპინძლის ორგანიზმში ბინადარი მიკრობების (ბაქტერიები, სოკოები, ვირუსები, პროტისტები და არქეა) ერთობლიობა.
პათოსფერო – ეუკარიოტული მასპინძლის პათოგენური მიკროორგანიზმები და უხერხემლო მავნელბლები.მიკრობიომი – მიკრობიოტის ერთობლივი გენომი.
ჰოლობიონტი – ბიოლოგიური სტრუქტურის ერთეული, რომელიც მასპინძელსა და მის მიკრობიოტას მოიცავს.
ჰოლოგენომი – მასპინძლის, მისი ორგანელების გენომისა და მიკრობიომის ერთობლიობა.
პროტეომი – ორგანიზმის გენომის მიერ ექსპრესირებული პროტეინების ერთობლიობა.
ტრანსკრიპტომი – გარკვეულ მომენტში ორგანიზმის მიერ სინთეზირებული რნმ –ის მოლეკულათა ნაკრები.
მაკრობი – ეუკარიოტული მასპინძელი ორგანიზმი.

თეზისის სტრუქტურა.

თავი 1. შესავალი, იგი მოიცავს:

1.1 კვლევის სფეროს მოკლე მიმოხილვას

1.2 კვლევის მიზნებსა და ამოცანებს

თავი 2. ლიტერატურის მიმოხილვას, რომელშიც მოცემულია:

- *Apis mellifera*–ს ეკოსისტემის იმ ბიოლოგიური თავისებურებების მიმოხილვა, რომლებიც მჭიდროდ არიან დაკავშირებულნი მიკრობული რესურსის მენეჯმენტის არსთან, რაც ფუტკრების ეკოსისტემის ბიოტური ფაქტორებიდან სიმბიონტი მიკროორგანიზმების განსაკუთრებული როლის ხაზგასმას გულისხმობს.
- საკითხზე არსებული სამეცნიერო გამოცდილებისა და თანამედროვე თეორიული კვლევის ტენდენციების აღწერა.

თავი 3. მეთოდოლოგიური მიდგომის შერჩევას, რომელიც ეძღვნება:

- კვლევის მეთოდოლოგიური მიდგომის გაცნობასა და კვლევის მიზანსა და ამოცანებთან მისი შესატყვისობის დასაბუთებას.

თავი 4. მასალებსა და მეთოდებს: კვლევის მეთოდიკის აღწერას.

თავი 5. მიღებულ შედეგებსა და მათ განხილვას:

- *in vivo* და *in vitro* კვლევის მოდელების გამოყენებით მიღებული შედეგების დემონსტრირებას;
- შედეგების ინტერპრეტაციას, ანალიზსა და დასკვნებს.

თავი 1. შესავალი

1.1 კვლევის სფეროს მოკლე მიმოხილვა

მეთაფლე ფუტკარსა (გვარი – *Apis*) და კაცობრიობას შორის დამყარებული განსაკუთრებული ურთიერთობა ათასწლეულებს მოითვლის, რაც ამ მწერის მიერ მრავალი ტიპის სარგებლის მოტანითა და მისი ინდუსტრიალიზაციის შესაძლებლობითაა განპირობებული (Kotthoff, Wappler, and Engel 2013). ამაზე მეტყველებს ანტიკური ცივილიზაციის ისტორიული მასალები. ჩვენთან, საქართველოში აღმოჩენილი და შესწავლილი ნამარხები კი, გვამცნობს, რომ მეფუტკრეობას საქართველოში ბრინჯაოს ხანაშიც მისდევდნენ (Kvavadze *et al*. 2007).

მეფუტკრეობიდან მიღებული ტრადიციული საკვები პროდუქტებისგან განსხვავებით, რომლებიც გარდა კვებითი ღირებულებისა სამკურნალო თვისებებითაც გამოირჩევიან, ფუტკრის, როგორც მნიშვნელოვანი დამმტვერავის როლი მხოლოდ გასულ საუკუნეში იქნა შემჩნეული და შესწავლილი. დღესდღეობით სასოფლო სამეურნეო კულტურებისა და ველურ ბუნებაში არსებული მცენარეების დამტვერვით ფუტკრის მიერ გაწეული სამსახური შეუფასებლადაა აღიარებული (Kotthoff, Wappler, and Engel 2013; Gallai *et al*. 2009; Klatt *et al*. 2014).

ბოლო ათწლეულებში ბუნებაში მიმდინარე დრამატული ცვლილებების კვალდაკვალ დამმტვერავი მწერების ეკოსისტემაში მწვავე პრობლემებმა იჩინა თავი. მეთაფლე ფუტკრების კოლონიების დაავადების, დასუსტებისა და რაოდენობის შემცირების მზარდი მონაცემების სტატისტიკა სწორედ ამაზე მიუთითებს (Simon G. Potts *et al*. 2010). ამ დროს დამტვერვის სერვისის შესასრულებლად ფუტკრებზე მოთხოვნა 5-ჯერ აღემატება ინდუსტრიულ მეფუტკრეობაში მოქცეული პოპულაციების რეალურ პოტენციალს (Breeze *et al*. 2014).

თანამედროვე მეფუტკრეობა, ისევე როგორც სოფლის მეურნეობის სხვა დარგები, მიმდინარე ტენდენციის - მონოკულტურული ფერმერული მეურნეობისა და ფარმაკოქიმიური ხასიათის პრევენციული და დაცვითი ღონისძიებების ექსტენსიური გამოყენების გავლენის ქვეშაა მოექცეული. პრობლემას ამწვავებს კლიმატური პირობების ანომალიური ცვლილებები და გარემოს დაბინძურება მავნე ნარჩენებით, ასევე ინდუსტრიული მეფუტკრეობისთვის დამახასიათებელი მთაბარობა (Simon G. Potts *et al*. 2010; Klein *et al*. 2007).

გლობალიზაციური მოვლენების პარალელურად ფუტკრის სახეობებისა და ჯიშების მიერ ახალი საარსებო გარემოს ათვისებასთან ერთად, მათი პათოგენების გავრცელების არეალის გაფართოების ფენომენმა პრობლემა განსაკუთრებულად გაამწვავა. მაგალითისთვის პარაზიტი ტკიპას *Varroa*

destructor- ის მისთვის უჩვეულო საარსებო არეალში აღმოჩენა შეიძლება მოვიყვანოთ. ამ პარაზიტის გავრცელებამ ფუტკრის სხვადასხვა ტიპის მიკრობული პათოგენების გავრცელებასაც შეუწყო ხელი (Sammataro, Gerson, and Needham 2000; Martin *et al*. 2012).

განსაკუთრებული ყურადღების ქვეშაა მოქცეული მეთაფლე ფუტკრის კოლონიების მასიური და სწრაფი დაღუპვის ფენომენი – Colony Collapse Disorder (CCD), რომელიც ბოლო ათწლეულების განმავლობაში პლანეტის სხვადასხვა ადგილზე აღინიშნება. CCD-ს ეტიოლოგიური ფაქტორების კვლევისას ძირითადი აქცენტი ვირუსულ დაავადებებზე კეთდებოდა (Bromenshenk *et al*. 2010), ეს მოსაზრება დღეისთვისაც ინტენსიური სამეცნიერო განხილვის საგნია (Tokarz *et al*. 2011; Foster 2011).

ამჟამად, მეცნიერები მიიჩნევენ, რომ პარაზიტულ და ინფექციურ დაავადებებს მნიშვნელოვანი როლი აკისრიათ CCD ფენომენის განვითარებაში, და ხაზგასმით აღნიშნავენ, რომ მათი ნეგატიური გავლენა ფუტკრების კოლონიების იმუნური სისტემის დათრგუნვის ფონზე კიდევ უფრო გამწვავებულია.

იმუნოსუპრესიის სავარაუდო მიზეზებად კი კვებით სტრეს (Huang 2012), გარემოს მავნე ნარჩენებით დაბინძურებას, სოფლის მეურნეობაში პესტიციდების ინტენსიურ გამოყენებასა (Di Prisco *et al*. 2013) და მეფუტკრეობის პრაქტიკაში მიტიციდური (Boncristiani *et al*. 2012) და ანტიმიკრობული პრეპარატების (Quintana 2015) გამოყენებას ასახელებენ.

დადგენილია, რომ თანამედროვე სოფლის მეურნეობის მეტად მოთხოვნადი სერვისის, მცენარეული მონოკულტურების დამტვერვის დროს, ფუტკრის კოლონიების თავდაცვითი მექანიზმების ეფექტურობა კლებულობს, ამავე დროს საგრძნობლად მატულობს მათში პათოგენური მიკროორგანიზმების რაოდენობა. ამ დროს იმუნური სისტემის სუპრესია შესაბამისი ფუნქციური გენების ϰგუფის ტრანსკრიპციის დათრგუნვითაა განპირობებული (Morimoto *et al*. 2011).

თანამედროვე კვლევების მონაცემებით სხვადასხვა ტიპის სტრეს-ფაქტორების ფუტკრებზე ერთდროულ მოქმედებას სინერგიული ნეგატიური ეფექტი აქვს (Aufauvre *et al*. 2012), ამდენად მეთაფლია ფუტკრის დაცვის სტრატეგიაც კომპლექსურად უნდა განვიხილოთ, რაც ამ მწერის ეკოსისტემის დეტალურ შესწავლასა და მისი თავისებურებების გათვალისწინებას გულისხმობს (Becher *et al*. 2013).

ფუტკრის დაავადებათა კონტროლის კონვენციურ მეთოდებს დიდი ნაკლოვანებები აქვთ. მაგალითად, ანტიბიოტიკოთერაპიის მიღებული პრაქტიკა ფუტკრებში დისბაქტერიოზითა და ანტიბიოტიკების მიმართ რეზისტენტული მიკროორგანიზმების სელექციით სრულდება (Jay D. Evans 2003), მსგავს ფენომენს ადგილი აქვს აკაროზების სამკურნალოდ მიტიციდური პრეპარატების გამოყენების დროსაც (Vandervalk and Nasr 2014).

ცნობილია, რომ დაავადებათა პრევენცია მათ წინააღმდეგ ბრძოლის ოპტიმალური სტრატეგიაა. მის განსახორციელებლად კი კომპლექსური მიდგომაა საჭირო, რაც ეკოლოგიური მდგომარეობის გაუმჯობესებასა და საკარანტინო და სანიტარული ნორმების დაცვას გულისხმობს, ეს კი, ხშირად რთული განსახორციელებელია. პათოგენების სამიზნე ორგანიზმებში მათ მიმართ მდგრადობის ამაღლება ასეთ ვითარებაში ერთ-ერთი ოპტიმალური გამოსავალი იქნებოდა. ამისათვის აუცილებელია, მეთაფლე ფუტკრის ბუნებრივი იმუნური სისტემის ჩამოყალიბების ასპექტების, მოქმედების პრინციპებისა და მისი სტატუსის განმაპირობებელი ფაქტორების შესწავლა.

ნიშანდობლივია, რომ თავიანთ მასპინძელს პათოგენ მიკროორგანიზმებთან გამკლავებაში სიმბიონტი მიკროორგანიზმები ეხმარებიან, რაც ხშირად მათი პირდაპირი ანტაგონიზმის უნარითაა განპირობებული, ზოგჯერ კი მხოლოდ მათ მიერ საარსებო ნიშის სრული ათვისებით. ასეთ დროს პათოგენებისთვის, უბრალოდ, „ადგილიც" კი არ რჩება. არანაკლებ საინტერესოა ამ ბაქტერიების უნარი, „გაწვრთნან" მასპინძლის იმუნური სისტემა. ბინადრობენ რა მასპინძლის საჭმლის მომნელებელ ტრაქტში, ისინი იმუნური სისტემის მუდმივი გამღიზიანებლის როლს თამაშობენ და მის მოდულაციას იწვევენ (Mazmanian *et al*. 2005).

მრავალუჯრედიან ორგანიზმებში არაპათოგენური ენდოგენური მიკროფლორის – მიკრობიოტის მიერ მასპინძლისთვის მრავალმხრივი ფუნქციური სამსახურის გაწევის შესაძლებლობებზე ლუი პასტერისა და ილია მეჩნიკოვის დროიდან მსჯელობენ.

დღესდღეობით ენდოგენური მიკროფლორა განიხილება, როგორც მასპინძლის ორგანიზმში მოქცეული მიკრობული ორგანო, წარმოდგენილი სხვადასხვა სახეობის მიკროორგანიზმებით, რომლებსაც ახასიათებთ მასპინძელთან და ერთმანეთს შორის კომუნიკაციის უნარი. ისინი მონაწილეობენ მასპინძლის ნივთიერებათა ცვლაში და მასში რთული ბიოქიმიური გარდაქმნების მედიატორებად გვევლინებიან. ამ ორგანოში მიახლოებითი გათვლებით მასპინძლის გენებთან შედარებით 100-ჯერ მეტი გენია წარმოდგენილი, რომელთა ფუნქციური თავისებურებებითაც გარდა თავად მიკრობებისა, სწორედ მასპინძელი სარგებლობს (Bäckhed *et al*. 2005).

ბოლო ორ ათწლეულში ჩატარებულმა *Apis mellifera*-ს მიკრობიომის კვლევამ ხერხემლიანების მიკრობიომთან შედარებით მიკროორგანიზმების ლიმიტირებული, მაგრამ ამავე დროს სახეობა-სპეციფიური მრავალფეროვნება აჩვენა (Sabree, Hansen, and Moran 2012), რაც ხაზს უსვამს ამ ბაქტერიებისა და მათ მასპინძელს შორის ჩამოყალიბებულ განსაკუთრებულ დამოკიდებულებას. ეს ერთი შეხედვით, პრობიოტიკური ფორმულების შესადგენად მეფუტკრეობაში სხვადასხვა ტიპის პათოლოგიების პრევენციისთვის ენდოგენური ბაქტერიული შტამების შერჩევას უნდა აადვილებდეს. თუმცა

ამჟამად საკითხთან დაკავშირებული ფუნდამენტური კვლევის დეფიციტი ძირითად დამაბრკოლებელ ფაქტორად გვევლინება.

მეფუტკრეობისთვის პრობიოტიკური პრეპარატების შესაქმნელად მათი ბუნებრივი მიკროფლორიდან კონკრეტული თვისებების მქონე ბაქტერიული შტამების შერჩევაა საჭირო, რაც მიკრობიოტის, როგორც მთლიანი სუბ-ეკოსისტემის, შესწავლის გარეშე შეუძლებელია.

მიკრობიოტის მნიშვნელოვან ნაწილს რძემჟავა ბაქტერიები წარმოადგენენ. მეცნიერები მათ განსაკუთრებული ინტერესით სწავლობენ მრავალი, გამოყენებადი სასარგებლო ბიოქიმიური თვისებების ქონის გამო. ამ ჯგუფის ბაქტერიების გამოყენების არეალი ფართოა და მათ სხვადასხვა ბიოქიმიურ თვისებას წარმატებით იყენებენ ძირითადად კვების მრეწველობასა და მედიცინაში.

1.2 კვლევის მიზანი და ამოცანები

სადოქტორო პროგრამაში ჩართვისას გადავწყვიტე, მემუშავა მეთაფლე ფუტკრებში ბინადარ სიმბიონტ ბაქტერიებზე. არჩევანს განაპირობებდა ჩემს საქმიანობაში – მეფუტკრეობაში - არსებულ დაავადებათა კონტროლის პრობლემები და მათ გადაწყვეტაში ჩემი წვლილის შეტანის სურვილი. ასევე გ. ელიავას ბაქტერიოფაგიის, მიკრობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტში რძემჟავა ბაქტერიების შესწავლის მიმართულებით დაგროვილი გამოცდილება.

ფუტკრის დაავადებებთან ბრძოლის კონვენციური მეთოდები თავიანთი აგრესიულობით, გვერდითი უარყოფითი მოვლენების დიდი ალბათობით, ადამიანის ჯანმრთელობისთვის საშიში მოვლენების თანხლებითა და, ზოგადად, ეკოსისტემისთვის ზიანის მომტანი თავისებურებებით ხასიათდება.

წარმოდგენილი კვლევის მიზანი ფუტკრის ენდოგენური ფრუქტოფილური რძემჟავა მიკროფლორის პრობიოტიკური პოტენციალის შესწავლა იყო. მეფუტკრეობაში დაავადებათა კონტროლის ალტერნატიული, ეკომეგობრული გზის - მიკრობული რესურსის მენეჯმენტის პოტენციალის ამოქმედებისთვის ეს აუცილებელი წინაპირობაა.

მიზნის მისაღწევად დაისახა შემდეგი ამოცანების შესრულება:

- გამოგვეყო ენდოგენური რძემჟავა ბაქტერიები მეთაფლე ფუტკრის გამოგვეყო ენდოგენური რძემჟავა ბაქტერიები მეთაფლე ფუტკრის ქართული პოპულაციების ჯანსაღი კოლონიებიდან;
- გამოგვევლინა მათი სახეობრივი მრავალფეროვნება;
- შეგვესწავლა მათი სავარაუდო პრობიოტიკური თვისებების სპექტრი და ეკოლოგიური თავისებურებები.

პრობიოტიკური თვისებების სპექტრში იგულისხმება: იმუნომოდულატორული პოტენციალი, ანტიბაქტერიული აქტივობა, სოკოების მიმართ ანტაგონიზმი, ენზიმური აქტივობა: პროტეოლიზური და ამილოლიზური თვისებები. ეკოლოგიური მახასიათებლებიდან კი ადჰეზიური თვისებები და ანტბიოტიკორეზისტენტობა შევისწავლეთ, ვინაიდან ისინი კანდიდატი პრობიოტიკი ბაქტერიების შერჩევისთვის აუცილებელ მონაცემებს იძლევიან. კონკრეტულ ეკოლოგიურ ნიშაში ბაქტერიების მიერ ეფექტური და უსაფრთხო გავლენის მოსახდენად ამ წინაპირობების გამოვლენას განსაკუთრებული მნიშვნელობა გააჩნია.

თავი 2. ლიტერატურის მიმოხილვა

2.1 *Apis mellifera*– ს ეკოსისტემა და მასზე ბიოტური და აბიოტური ფაქტორების გავლენა.

დასავლური მეთაფლე ფუტკარი - *Apis mellifera*-ს ბუნებრივი გავრცელების არეალი აფრიკისა და ევრაზიის კონტინენტის დიდ ნაწილს მოიცავს, რაც სახეობის განსხვავებული ეკოლოგიური პირობების მიმართ მოქნილი ადაპტაციის უნარზე მეტყველებს. გლობალურ ეკოსისტემაზე დიდი გავლენა იქონია ადამიანის მიერ ამ სახეობის შეყვანამ დანარჩენ სამ კონტინენტზე, რამაც, თავის მხრივ, მეთაფლე ფუტკრის გავრცელების არეალის გაფართოება გამოიწვია (M. L. Wilson 1987). ამ მწერის სხვადასხვა რასებს შორის მიგრაციისას დამყარებულ კავშირებს მეთაფლე ფუტკრის ფაუნის ჰეტეროგენურობამდეც მივყავართ. ამავე დროს, ახალი საარსებო არეალის დაკავებისას, წარმოქმნილი უჩვეულო კონკურენტული გარემოებები ენტომოფაუნას ცვლის (Kotthoff, Wappler, and Engel 2013; Goulson 2003).

ბოლო ორ ათწლეულში გამოცემული სამეცნიერო წყაროების თანახმად, *Apis mellifera* –ს კოლონიების რაოდენობრივი შემცირების მიზეზები კომპლექსურია. მკვლევარები მათ მიერ არჩეული კონკრეტული ეტიოლოგიური სამიზნის შესწავლისას გვერდს ვერ უვლიან სხვადასხვა ბიოტური და აბიოტური ფაქტორების ერთმანეთთან დაკავშირებასა და მოპოვებული სამეცნიერო შედეგების სინთეზურ ანალიზს.

მეთაფლე ფუტკრის ეკოსისტემის კომპონენტების სრულფასოვანი აღქმა, ამ მწერის ბიოლოგიისა და მასთან დაკავშირებული პრობლემების შესწავლის ერთ-ერთი მთავარი წინაპირობაა. ამდენად, მეთაფლე ფუტკართან დაკავშირებული პრობლემატიკის კვლევა მის, როგორც ეკოსისტემის განუყოფელი ერთეულის, შესწავლას მოითხოვს.

ეკოსისტემა განსაზღვრულ არეალში ბიოტური და აბიოტური კომპონენტების ეფექტური ფუნქციური ურთიერთქმედების ფენომენია, რომელიც ნივთიერებათა და ენერგიის ცვლის მეშვეობით აყალიბებს თავის სათუთ სახეს (Buddington 2009). ეკოსისტემის მდგრადობა ორივე კომპონენტის მუდმივობის, ან მათი დინამიური ცვლილებების ციკლების მუდმივობის პირობებშია შესაძლებელი.

აბიოტური ფაქტორების მოდიფიკაცია ზოგჯერ ბიოტური ფაქტორებითაა განპირობებული, მაგალითად, გლობალური კლიმატური ცვლილებები ნაწილობრივ ადამიანის ქმედებებითაა გამოწვეული. ამდენად, ზღვარი ბიოტურ და აბიოტურ ფაქტორებს შორის ხშირად პირობითია და, უფრო სწორი იქნება, თუ ვიტყვით, რომ ისინი ერთმანეთს განაპირობებენ.

ფუტკრის ეკოსისტემის ბიოტურ ფაქტორებში გარემოში ფლორისა და ფაუნის ბიომრავალფეროვნება იგულისხმება. ერთი შეხედვით, თვალით

ხილული-მაკროორგანიზმებისგან შემდგარი ეკოსისტემა, სინამდვილეში გაცილებით უფრო მრავალფეროვანია და უხილავ ცოცხალ არსებებს – მიკროორგანიზმებსაც მოიცავს. თანამედროვე კვლევების თანახმად მეთაფლე ფუტკრის ეკოსისტემაში მიკროორგანიზმებს მნიშვნელოვანი დადებითი და უარყოფითი დატვირთვა აქვთ (Jay D. Evans and Schwarz 2011).

2.2 მეთაფლე ფუტკრის დამახასიათებელი მიკრობული სამყარო. სიმბიოზი, კომენსალიზმი, პარაზიტიზმი.

მეთაფლე ფუტკარი *(Apis mellifera)* სოციალური მწერია. მისი ბიოლოგიური თავისებურებები, განსაკუთრებით კი სოციალური ქცევა და მრავალი ინდივიდის ერთ ოჯახად ფუნქციონირება, თანმდევი მიკრობული სამყაროს არსებობისთვის სპეციფიკურ მიკროგარემოს აყალიბებს.

მიკროორგანიზმების შესწავლისთვის შემუშავებული მოლეკულური ბიოლოგიის თანამედროვე მეთოდების დახვეწას, ფუტკრის ეკოსისტემაში არსებული უამრავი, აქამდე უცნობი მიკროორგანიზმის, მათი ერთმანეთთან და მასპინძელთან მრავალფეროვან ურთიერთობათა ამსახველი დეტალების აღმოჩენა მოჰყვა (Runckel *et al*. 2011; Singh *et al*. 2010).

ასეთი პროგრესი არა მხოლოდ მიკრობული „პათოსფეროს" (Randles 1999; Cox-Foster *et al.* 2007) მიმართ აღმოჩნდა ეფექტური, არამედ მიკრობებსა და ფუტკრებს შორის არსებულ სიმბიოტურ კავშირებსაც მოჰფინა ნათელი (P. Engel, Martinson, and Moran 2012; N. A. Moran *et al.* 2012).

Apis mellifera–ს პოპულაციების გენომის ბოლოდროინდელი კვლევების დამსახურებით, სამეცნიერო საზოგადოებამ მიკრობულ პათოსფეროსა და მიკრობიოტის შესახებ უფრო სრული წარმოდგენა მიიღო. ამ პროგრესმა ახალი ჰიპოთეზა წარმოშვა – ჰოლოგენომის პარადიგმის ჭრილში განიხილონ საკუთრივ ფუტკრის, მისი მიკრობიოტისა და პათოსფეროს გენომთა კომპლექსი. ასეთი კომპლექსური მიდგომა უმთავრეს წინაპირობას შექმნის ფუტკრების პოპულაციებში მიმდინარე დესტრუქციულ მოვლენათა და მათ განმაპირობებელ არაერთგვაროვან სტრესფაქტორთა გავლენის დასადგენად (Schwarz, Huang, and Evans 2015).

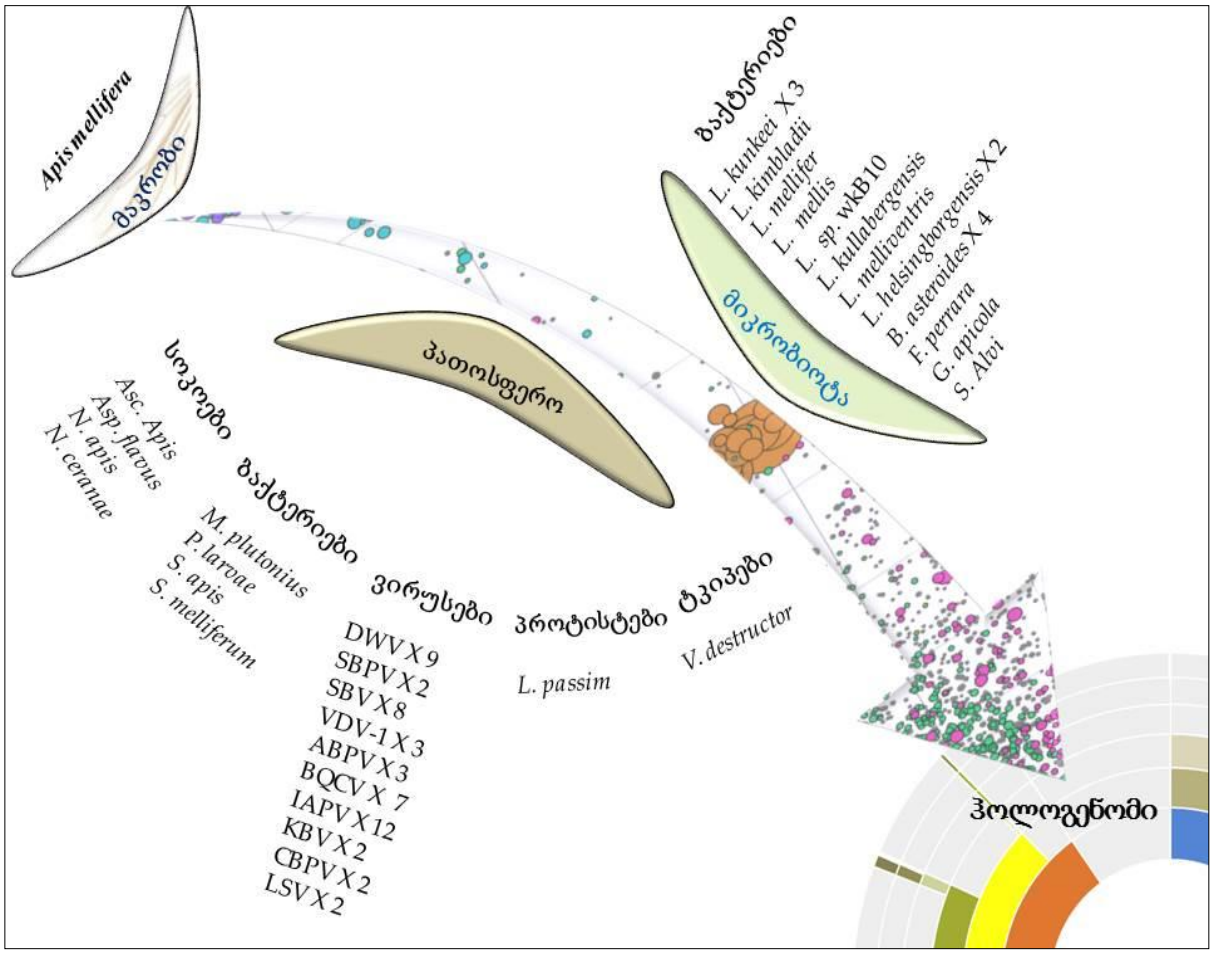
მრავალუჯრედიანი ეუკარიოტული ორგანიზმების, როგორც დამოუკიდებლად არსებული ბიოლოგიური ერთეულების კლასიფიკაცია, რადიკალურად იცვლება ახალი, კომპლექსური ხედვით. თანამედროვე წარმოდგენით მრავალუჯრედიანი ორგანიზმი დამოუკიდებელი ბიოლოგიური ერთეული არასდროს ყოფილა და ის რთულ ბიოლოგიურ არქიტექტურას – ჰოლობიონტს წარმოადგენს, მისი შემადგენელი ელემენტები კი მაკრობი და მიკრობიოტაა (Bordenstein and Theis 2015).

ჰოლოგენომის თეორიის (Zilber-Rosenberg and Rosenberg 2008)

თანახმად, მასპინძლისა და მიკრობიოტის გენომთა (მიკრობიომი) ევოლუცია ერთმანეთის პარალელურად მიმდინარეობს და ბუნებრივი გადარჩევის პრინციპს ემყარება. ამ მოდიფიკაციის მთავარი მაპროვოცირებელი კი პათოგენები და გარემოს სხვა ბიოტური და აბიოტური ფაქტორები არიან.

ჰოლოგენომის თეორიის ჭრილში, ჰოლობიონტის ყოველი დამოუკიდებელი სისტემა განუმეორებელი მუტანტის სახეს ქმნის, ვინაიდან მისი აბსოლუტური გენომის კომპონენტებად მიკრობიომისა და მაკრობის უჯრედის ბირთვსა და ორგანელებში მოქცეული გენების უნიკალური ნაკრებია. ბუნებრივია, ასეთ ქაოტურ გარემოში გენეტიკური მრავალფეროვნების გამდიდრების ყველა შესაძლო მექანიზმი მუშაობს: გენების ჰორიზონტალური ტრანსფერი (გადაცემა), რეკომბინაცია, გენების დაკარგვა ან დუბლიკაცია (Bordenstein and Theis 2015).

Apis mellifera– ს ჰოლოგენომის მოკლე (მხოლოდ მცირე ნაწილის ამსახველი) სქემა, შვარცის (Schwarz, Huang, and Evans 2015) მიხედვით, წარმოდგენილია სურათი 1–ზე, სადაც კარგად ჩანს, თუ რამდენად დიდი ადგილი უჭირავთ მიკროორგანიზმებს *Apis mellifera*–ს ცხოველმყოფელობაში. ჰოლოგენომის სქემა აგებულია *Apis mellifera*–ს, მიკრობიოტის წარმომადგენელი 12 ბაქტერიული სახეობისა და პათოსფეროს წარმომადგენელ 18 სახეობის ორგანიზმთა სრულად სექვენირებული გენომების (სულ 60 გენომი) მაგალითზე.



სურ.1 *Apis mellifera*– ს ჰოლოგენომის შესწავლილი ნაწილის მოკლე სქემა

მეთაფლე ფუტკრები მგრძნობიარენი არიან მრავალი ტიპის მიკრობული პათოგენის მიმართ, როგორებიცაა: ბაქტერიები, ვირუსები, პროტოზოა, სოკოები. მათი მავნე ზემოქმედების შედეგად, ინდუსტრიულ მეფუტკრეობას ყოველწლიურად დიდი ზარალი ადგება. განსაკუთრებული ზიანის მომტანია:

1. ბაქტერიული დაავადებები: ამერიკული სიდამპლე, ევროპული სიდამპლე (გამომწვევები: *Paenibacillus larvae, Melissococcus plutonius*);

2. სოკოვანი დაავადებები: ჩაკირული ბარტყი, გაქვავებული ბარტყი (გამომწვევები: *Aspergillus fumigatus, Aspergillus flavus, Aspergillus niger, Ascosphaera apis*);

3. ვირუსული დაავადებების ფართო სპექტრი: პარკუჭა ბარტყის ვირუსი, დეფორმირებული ფრთის გამომწვევი ვირუსი, ისრაელი დამბლის ვირუსი ქრონიკული დამბლა (გამომწვევი: DWV, IAPV, CBPV);

4. მიკროსპორიდიული გენეზის დაავადება - ნოზემოზი (გამომწვევი: *Nosema apis, Nosema ceranae*).

ჩამოთვლილი დაავადებების გავრცელება ნეგატიურად არა მხოლოდ ინდუსტრიულ მეფუტკრეობაზე აისახება, არამედ ველურ ბუნებაში

არსებული დამმტვერავების პოპულაციებსაც აზიანებს (M. Wu and Sugimura 2013; Fürst *et al*. 2014).

აღსანიშნავია, რომ ფუტკრის ეკოსისტემაში მოქცეული მიკროორგანიზმების სახეობების უმეტესობა მასთან სიმბიოზურ კავშირშია, ან მხოლოდ კომენსალური ურთიერთობით შემოიფარგლება (Jay D Evans and Armstrong 2006).

სიმბიოზის, კომენსალიზმისა და პათოგენურობის ფენომენთა აღქმა არსებულ სამეცნიერო გამოცდილებასა და შეხედულებებს ეფუძნება, რომლებიც დროთა განმავლობაში იცვლება. როგორც წესი, მასპინძელსა და მის მიკრობულ რეზიდენტებს შორის ურთიერთობის სტატუსის აღსაწერად მეცნიერები ტერმინ – კომენსალიზმს იყენებენ, რაც ორი ტიპის ორგანიზმის თანაცხოვრებისას ცალმრხივ სარგებელს გულისხმობს. ეს სწორედ მეცნიერების ხელთ არსებული მიკრობიოტის არასრულფასოვანი ცოდნით და მოვლენათა ინტერპრეტაციის სიფრთხილითაა განპირობებული (Bäckhed *et al*. 2005).

უნდა აღინიშნოის, რომ მიკროფლორის შესწავლას თავად მასპინძელი ორგანიზმის მრავალი ფიზიოლოგიური თავისებურების ახსნა შეუძლია, რაც მეთაფლე ფუტკრის მიკრობული სამყაროს კვლევას კიდევ უფრო საინტერესოს ხდის.

მეთაფლე ფუტკრის თანმხლები მიკრობული პათოსფეროსა და დანარჩენი სიმბიონტი თუ კომენსალი მიკროორგანიზმების საერთო პორტრეტს დიდწილად კოლონიის სოციალური სტრუქტურა განაპირობებს (Jay D. Evans and Schwarz 2011; Martinson *et al*. 2011). სოციალური ქცევა სხვადასხვა კასტებსა თუ თაობის ინდივიდებს შორის მიკროორგანიზმების მუდმივ გაცვლას უზრუნველყოფს, რითაც მაკრო- და მიკრო-ორგანიზმის ეფექტურ კოევოლუციას ხელსაყრელ პირობებს უქმნის (Philipp Engel and Moran 2013).

ამ თეორიის მტკიცებულება მეთაფლე ფუტკრის კოლონიის დამახასიათებელი მიკროორგანიზმების სპეციფიური მრავალფეროვნების მუდმივობაა. ცნობილია, რომ ფუტკრის იმაგოს ფორმების ნაწლავურ ტრაქტში ბინადარი ბაქტერიების სხვადასხვა სახეობები მაღალი შიდასახეობრივი გენეტიკური მრავალფეროვნებით არიან წარმოდგენილნი (P Engel and Moran 2013a). თუმცა, აქვე უნდა აღინიშნოს, რომ წარმოდგენილ სახეობებში ყველა მათგანი არ წარმოადგენს სიმბიონტს (N. a. Moran 2015).

Apis mellifera– ს მიკრობიომს, მისი როლისა და კოლონიაში ლოკაციის მიხედვით, სამ პირობით ჯგუფად განვიხილავთ: ნაწლავური მიკროფლორა, ჭეოს მიკროფლორა და მიკრობული პათოსფერო.

ა) <u>ნაწლავური მიკროფლორა</u>

ნაწლავური მიკროფლორა - მიკრობიოტა ფუტკრის მიკრობული სამყაროს უმნიშვნელოვანეს ნაწილს წარმოადგენს. ტერმინის „მიკრობიოტა" გამოყენებისას, როგორც წესი, საჭმლის მომნელებელ ტრაქტში ბინადარი არაპათოგენური მიკროორგანიზმების ნაკრებს გულისხმობენ.

ისევე, როგორც სხვა ცხოველებში, ფუტკრების იმაგო ფორმებში საჭმლის მომნელებელი ტრაქტი რთულ ეკოსისტემას წარმოადგენს და წარმოდგენილია მრავალფეროვანი მიკრობული ნაკრებით, რომელიც, უმეტესწილად, ბაქტერიებისგან შედგება. წინააღმდეგობრივი მოსაზრებებია გავრცელებული ფუტკრის ლარვებში რეპლიკაციის უნარის მქონე მიკრობული რეზიდენტების არსებობის შესახებ - მეცნიერთა ნაწილს ლარვისა და ჭუპრის სტადიაში მყოფი ინდივიდები ბაქტერიებისგან თავისუფლად მიაჩნია (Jay D Evans and Armstrong 2006; Martha Gilliam 1997). ლოგიკურია ვიფიქროთ, რომ ახლადგამოჩეკილი ფუტკრები კვებით და სხვა ტიპის ფუნქციურ ურთიერთობებში ჩაბმისთანავე მიკროფლორას უფროსი ასაკის ინდივიდებისგან აითვისებენ (Martha Gilliam 1997).

სიმბიოტური მიკროფლორის მნიშნელობა მრავალმხრივაა შესწავლილი ხერხემლიან ორგანიზმებში და დადგენილია, რომ ამ მიკროსკოპულ რეზიდენტებს შეუძლიათ მაკროორგანიზმის (პატრონის) იმუნური სისტემის მოდულაცია და განსხვავებული ტიპის მექანიზმების დახმარებით მასპინძლისთვის სხვადასხვა ტიპის სარგებლის მოტანა; კერძოდ, ისინი მონაწილეობენ რთულად მოსანელებელი ნივთიერებების დეგრადაციაში, დეტოქსიკაციაში, პათოგენური მიკროორგანიზმების დათრგუნვაში, ჩართულნი არიან ნაწლავურ ეპითელში არსებულ იმუნური სისტემის ერთეულებთან კომპლექსურ კომუნიკაციაში და მოქმედებენ როგორც მძლავრი იმუნომოდულატორები (Vásquez et al. 2012).

ფეხსახსრიანებში არსებული ნაწლავური მიკროფლორის კვლევები, ძირითადად, ნაწლავური მიკრობიოტის გენეტიკურ დახასიათებაზეა ფოკუსირებული (Endo and Salminen 2013; P. Engel, Martinson, and Moran 2012; M. Wu *et al.* 2013).

ფუტკრის ნაწლავური მიკროფლორის ბიომრავალფეროვნების შესახებ წარმოდგენა ბოლო ათწლეულების მანძილზე სწრაფად იცვლება. ეს გამოწვეულია საჭმლის მომნელებელი ტრაქტიდან მიკროორგანიზმების გამოყოფისა და დეტექციის მეთოდების სწრაფი ევოლუციით. მოლეკულური ბიოლოგიის თანამედროვე მეთოდების შემუშავებამდე მიკრობული ბიომრავალფეროვნების შესწავლა კულტივარების (ლაბორატორიულ პირობებში კულტივირებადი მიკროორგანიზმები) დახასიათებით შემოიფარგლებოდა. იმდროინდელი მონაცემებით სოციალური მწერის მიკრობიოტა დამახასიათებელ სურათს მწერის ასაკის, სეზონისა და

გეოგრაფიული მდებარეობის მიხედვით იცვლიდა (Martha Gilliam and Valentine 1974; Gilliam, M., Lorenz, B.J., Richardson 1988).

პირველი თაობის კვლევების მონაცემებით, ფუტკრის ნაწლავური მიკროფლორა გრამ-დადებითი: *Bacillus, Lactobacillus, Bifidobacterium, Corynebacterium, Streptococcus, Clostridium* და გრამ-უარყოფითი: *Achromobacter, Citrobacter, Enterobacter, Erwinia, Escherichia coli, Flavobacterium, Klebsiella, Proteus, Pseudomonas* სახეობის ბაქტერიებით შემოიფარგლებოდა (Martha Gilliam 1997).

16S რიბოსომული რნმ–ის სექვენირებისა და მეტაგენომური ტექნიკის განვითარებამ, მეთაფლე ფუტკრების მიკრობიოტის სახე უფრო სრულად წარმოადგინა. ცხადი გახდა, რომ მიკრობიომის ძირითადი ნაწილი მათში მუდმივია და არ არის ფუტკრის ჯიშსა და გავრცელების გეოგრაფიულ არეალზე დამოკიდებული (Cox-Foster *et al.* 2007).

ინდივიდის ასაკობრივ განვითარებასთან დაკავშირებული მიკრობიოტის სახეობრივი შემადგენლობის დინამიური ცვლილებები, დედა ფუტკრის მაგალითზე კარგად იქნა შესწავლილი. აღმოჩნდა, რომ ის ასაკთან ერთად იცვლება, კერძოდ, ლარვის სტადიაში მასში ნაწლავური ბაქტერიები *Escherichia* და Gamma-1 (*Gilliamella*) სჭარბობენ, რომლებიც მოგვიანებით იმაგოს ფორმებში Alphaproteobacteria-ს ჯგუფით ჩანაცვლდებიან (Tarpy, Mattila, and Newton 2015).

უფრო ზოგადი და მოცულობითი სურათი *Apis mellifera*- ს მუშა ფუტკრების კასტის ნაწლავური მიკრობიოტის მაგალითზეა შესწავლილი (P. Engel, Martinson, and Moran 2012) და მეტანეგომური კვლევის მონაცემებით ის სამი აქტიური ბაქტერიული ფილისგან: *Firmicutes, Proteobacteria* და *Actinobacteria*, შედგება (Lee et al. 2014). ამ სამი ფილის ქვეჯგუფების (Clade) მრავალფეროვნების შესწავლამ მათი გაცილებით ღრმა დიფერენცირება განაპირობა და არსებული კლადოგრამა უფრო მეტად გაამდიდრა: 1. Firm-4, Firm-5 (*Firmicutes*);

2. Bifido (*Actinobacteria*);

3. Alpha-2.1, Alpha- 2.2, Alpha-1, Beta, Gamma-1, and Gamma-2 (*Proteobacteria*) (Martinson et al. 2011).

ბუნებრივია, რომ მეტაგენომურმა კვლევებმა ცვლილებები ბაქტერიულ ტაქსონომიაშიც გამოიწვია, რაც ბაქტერიების ახალი გვარებისა და სახეობების აღმოჩენით იყო განპირობებული (Martinson et al. 2011; Philipp Engel, Kwong, and Moran 2013). სხვადასხვა კვლევებში აღმოჩენილი განსხვავებები მიკრობიოტის სურათებს შორის, როგორც წესი, მეცნიერული განვითარების სხვადახვა საფეხურებს შორის არსებული განსხვავებული მეთოდოლოგიური მიდგომების თავისებურებებით აიხსნება (M. Wu and Sugimura 2013).

სიმბიონტი მიკროორგანიზმების შესწავლამ დიდი პროგრესი განიცადა ფუნქციური გენომიკის განვითარების კვალდაკვალ (Marco, Pavan, and

Kleerebezem 2006), რამაც ფუტკრის მიკრობიოტის კვლევაც უფრო პროდუქტიული გახადა (P Engel and Moran 2013b).

ლაბორატორიულ პირობებში კულტივირებული მიკროორგანიზმების ფენოტიპის შესწავლა მათ ფიზიოლოგიურ თავისებურებებზე სრულფასოვან წარმოდგენას ხშირად არ იძლევა.

ფუტკრის ნაწლავური მიკრობიოტის მეტაგენომურმა კვლევამამ ამ ნიშაში ბინადარი მიკროორგანიზმების პოტენციურ ფუნქციურ დატვირთვასა და ძუძუმწოვრების დამახასიათებელ მიკრობიოტის ფუნქციურ მრავალფეროვნებას შორის მსგავსება გამოავლინა. განსაკუთრებულ ყურადღებას ბიოფილმების წარმოქმნაზე პასუხისმგებელი და ენზიმური აქტივობის განმაპირობებელი გენების აღმოჩენა იწვევს (P. Engel, Martinson, and Moran 2012).

სოციალური მწერების ნაწლავური მიკროფლორა მეცნიერების მიერ იმუნური სისტემის დანამატადაც კი (“Extended Immune Phenotype”(Koch and Schmid-Hempel 2011))

განიხილება, ვინაიდან მიკროფლორის შემადგენელი ბაქტერიები ანტიმიკრობული მეტაბოლიტების სინთეზს ახდენენ და გარემოში გამოთავისუფლდებიან. ამავდროულად, ბაქტერიული უჯრედის კომპონენტები (მაგ. პეპტიდოგლიკანის შრე) ანტიგენური თვისებებით გამოირჩევიან და მუდმივ კომუნიკაციაში არიან მასპინძლის იმუნურ სისტემასთან.

ენდოგენური სიმბიოტური ბაქტერიების მიერ მასპინძელი ორგანიზმის იმუნური სისტემის მოდულაციის ფენომენი განსაკუთრებული ინტერესის საგანია. მეცნიერები სხვადასხვა ტიპის ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებების იმუნომოდულატორული პოტენციალის დადგენას ცდილობენ, რომლებიც შეძლებენ მეთაფლია ფუტკრებში ანტიმიკრობული პეპტიდების სინთეზის გაზრდის ხარჯზე იმუნური სტატუსის გაძლიერებას.

დამტკიცდა, რომ მეთაფლია ფუტკრის ზრდასრულ ინდივიდებში *Escherichia coli* - ის ცოცხალი უჯრედებით ექსპერიმენტულ ინფექციას მაკროორგანიზმი საპასუხო რეაქციით - ანტიმიკრობული პეპტიდების სინთეზით – პასუხობს (Gätschenberger *et al*. 2013).

არაპათოგენური მიკროორგნიზმებით ფუტკრის ნაწლავურ ტრაქტზე ზემოქმედებამ მსგავსი საპასუხო ეფექტი აჩვენა. ფუტკრებში მათი გამოყენება ანტიმიკრობული პეპტიდების: აბაეცინი, დეფენსინისა და ჰიმენოპტაეცინის მაკოდირებელი გენების ექსპრესია და ჰემოლიმფაში ანტიმიკრობული პეპტიდის - აბაეცინის რაოდენობის მომატებით ხდება (Jay D Evans and Lopez 2004; Yoshiyama *et al.* 2013). იგივე ტიპის რეაქციას ადგილი აქვს ბაქტერიების *P. larvae* და *M.plutonius* მიერ გამოწვეული ინფექციების განვითარების დროსაც (Ilyasov *et al*. 2012).

მეთაფლე ფუტკრის მიკრობიოტის ფილოტიპები საჭმლის მომნელებელი ტრაქტის მიკროეკოლოგიური ნიშების: ჩიჩახვისა და ძირითადი ტრაქტის შესაბამის პირობით ჯგუფებად იყოფა. ძირითადი ტრაქტის ფილოტიპი, სავარაუდოდ, ფუტკრის პათოგენებისგან დაცვაში, დეტოქსიკაციასა და საკვები ნივთიერებების ათვისებაში მონაწილეობს (Schwarz, Huang, and Evans 2015). ჩიჩახვის მიკრობიოტა კი პირველადი დაცვის ხაზის უნიკალურ ბარიერს ქმნის. ვინაიდან, ჩიჩახვი წარმოადგენს შეგროვილი ნექტრის საწყის რეზერვუარს, რომელიც კოლონიაში ნექტრის შემდგომ გადამუშავებაშიც მონაწილეობს, შესაბამისად, გარემოდან ორგანიზმში მოხვედრილ მიკროორგანიზმებსა და ტოქსინებს, პირველ რიგში ჩიჩახვის მიკრობიოტის ბარიერის გადალახვა უწევთ (Olofsson and Vásquez 2008).

მეთაფლე ფუტკრის ნაწლავური ტრაქტიდან გამოყოფილი ბაქტერიული კულტივარების მაგალითზე ჯერაც არ არის სრულყოფილად შესწავლილი, არც ის არის არგუმენტირებული ან დამტკიცებული, თუ კონკრეტულად რა თვისებებით და რა მექანიზმებით ეხმარებიან ეს მიკროორგანიზმები მათ ჯანმრთელობის შენარჩუნებაში.

ბ) <u>ჭეოს მიკრობული შემადგენლობა</u>

როგორც ცნობილია, მასპინძლის დიეტა მისი ნაწლავური მიკროფლორის სურათსაც განაპირობებს (Martínez *et al*. 2013; Lozupone *et al.* 2012).

მეთაფლე ფუტკრის დიეტაში, ჩვეულებრივ, ორი ძირითადი კომპონენტი: ცილებით მდიდარი ყვავილის მტვერი და თაფლი შედის (Keller, Fluri, and Imdorf 2005). თავისუფალი ამინომჟავების, პოლიფენოლებისა და სხვა ბიოლოგიურად აქტიური სასარგებლო ნივთიერებების შემცველობით ყვავილის მტვერი პოპულარულია, როგორც საკვები დანამატი და მრავალი ფარმაკოლოგიური პრეპარატის შემადგენელი კომპონენტი (Serra Bonvehi *at al.* 2001). ყვავილის მტვრის ხარისხი, პირველ რიგში, მისი ბოტანიკური შემადგენლობით, ეკოლოგიური სიჯანსაღითა და შენახვის პირობებით განისაზღვრება (Di Pasquale *et al*. 2013).

გარემოს პესტიციდებით დაბინძურების ინდიკატორად ხშირად ფუტკრების მიერ შეგროვილ ფეხგუნდას – ყვავილის მტვერს იყენებენ. შესწავლილია, რომ ყვავილის მტვერში მოხვედრილი ტოქსიკური ქიმიური ნარჩენები ფუტკრების სიკვდილიანობასთანაა დაკავშირებული (Krupke *et al*. 2012; Johnson *et al*. 2010). კვლევის საგნადაა ქცეული გენეტიკურად მოდიფიცირებული მცენარეებიდან მიღებული ყვავილის მტვრის უსაფრთხოების საკითხიც (Malone and Burgess 2009; Enkegaard and Kryger 2009).

ყვავილის მტვრის ტრანსფორმაციას ფუტკრები მისი შეგროვების პროცესშივე იწყებენ; მათი ანატომიური თავისებურებები ხელს უწყობენ ყვავილის მტვრის სწრაფ მოგროვებასა და მის ფეხგუნდად ქცევას (Rathcke 1983). ფეხგუნდა ერთიანი მასის სახეს ფუტკრების მიერ ყვავილის მტვრისთვის დამატებული ნექტრის წვეთის წყალობით იღებს (Thorp 1979). ამ დროს ნექტარს სანერწყვე ჯირკვლის სეკრეტიც ერევა (Margaoan *et al*. 2010). სავარაუდოდ, სწორედ ამ დროს ხდება ფუტკრის ენდოგენური ბაქტერიებით ყვავილის მტვრის პირველი კონტამინაცია.

სკაში მოტანილ ყვავილის მტვრის ფეხგუნდას ფუტკრები მაშინვე მოიხმარენ ზრდასრული ინდივიდების ან ლარვების საკვებად, ნაწილს კი მარაგის სახით ინახავენ (Thorp 1979). სწორედ შენახვის პროცესში ხდება მისი ჭეოდ გარდაქმნა. დადგენილია, რომ ჭეოს ქიმიური შემადგენლობა ახლადშეგროვილი ყვავილის მტვრის ფეხგუნდისგან განსხვავდება, რაც შენახვის პროცესში მიმდინარე რთულ ბიოქიმიურ გარდაქმნებზე მიუთითებს (Human and Nicolson 2006). ამ გარდაქმნებში რძემჟავა ბაქტერიების ფერმენტული აქტივობის როლზე სხვადასხვა კვლევები მიანიშნებენ (Herbert, Bee, and Shimanuki 1978; Vásquez and Olofsson 2009).

ბოლოდროინდელი კვლევების თანახმად, ფუტკრები ახლადშეგროვილი ფეხგუნდის საკვებად მოხმარებას არჩევენ (Anderson *et al*. 2014), ბოლოდროინდელი კვლევების თანახმად, ფუტკრები ახლადშეგროვილი თუმცა ყვავილის მტვრის წყარო ბუნებაში სეზონურია და ამინდის პირობებზეა დამოკიდებული. ამიტომ, ყვავილის მტვრის მარაგი მნიშვნელოვანია ფუტკრის კოლონიისათვის, ვინაიდან მისი ნაკლებობა უარყოფითად აისახება ფუტკრის ლარვების რაოდენობასა და კოლონიის ზრდაზე (Allen and Jeffree 1956; H R Mattila and Otis 2006).

ყვავილის მტვრის სტრუქტურა მის კარგ გამძლეობას განაპირობებს, რაც ნამარხ მასალებში მათი ნიმუშების პოვნითაც დასტურდება (Roulston and Cane 2000). თუმცა ფუტკრების მიერ ახლადშეგროვილ ყვავილის მტვერში არსებული ტენიანობა მიკრობების ზრდისთვის ხელსაყრელ პირობებს ქმნის (Margaoan *et al*. 2010), სავარაუდოდ, მისი მარაგის შესანახად ფუტკრები გარკვეულ ხერხს უნდა იყენებდნენ.

ფიჭებში ყვავილის მტვრის კონსერვაციაში რძემჟავა ბაქტერიების როლის შესახებ მოსაზრება ადრეულ კვლევებში გამოითქვა (Martha Gilliam 1997). ფიჭებში შენახვისას ყვავილის მტვრის ქიმიური შემადგენლობის ცვლილებაც ბაქტერიული ფერმენტაციის შედეგად მიიჩნიეს (Loper *et al*. 1980), რასაც ამ ბაქტერიების ენზიმური აქტივობით ხსნიდნენ. ასევე მიაჩნდათ, რომ სკაში ფერმენტირებული ყვავილის მტვერი – ჭეო უფრო ადვილად მონელებადი ხდებოდა ფუტკრებისთვის (Martha Gilliam 1997).

მხოლოდ რამდენიმე კვლევაა ჩატარებული ჭეოსა და თაფლის ბაქტერიული და სოკოვანი ფლორის ბიომრავალფეროვნების შესასწავლად (M

Gilliam 1979; Heather R. Mattila *et al*. 2012; Belhadj *et al.* 2014; Carvalho *et al.* 2010), გაცილებით ნაკლები კი ამ ბაქტერიების სიმბიოტური ხასიათის განმაპირობებელ ფუნქციურ შესაძლებლობებზე. საკითხი კიდევ უფრო საინტერესო გახდა მას შემდეგ, რაც ერთ-ერთი კვლევის თანახმად (González *et al*. 2005), ფუტკრების მიერ შეგროვებულ ყვავილის მტვრის ფეხგუნდაში აღმოჩენილი სოკოთა სახეობების: *Penicillium verrucosum, Aspergillus niger aggregate, Aspergillus carbonarius, Aspergillus ochraceus, Aspergillus flavus, Aspergillus parasiticus* და *Alternaria spp.* დიდი ნაწილი მიკოტოქსინების: ოქრატოქსინ A – სა და ალფატოქსინ B1, B2, G1 და G2 – ს პროდუცენტები აღმოჩნდნენ.

დალუქული ჭეოს ‘‘Entombed Pollen’’ ფენომენი, რომელიც ახლახან აღწერეს, შესაძლოა ასევე იყოს დაკავშირებული ჭეოში ნორმალური მიკროფლორის ბალანსის მოშლასთან (Van Engelsdorp*et al*. 2009).

ზემოთ მოყვანილი სათანადოდ დაუსაბუთებელი ჰიპოთეზების არსებობის გამო, ყვავილის მტვრის რძემჟავა ბაქტერიებისა და დამახასიათებელი მიკოფლორის ურთიერთდამოკიდებულების შესწავლა წარმოდგენილი კვლევის ერთ-ერთი ამოცანა გახლდათ.

გ) <u>*Apis mellifera* – ს პათოგენური მიკროორგანიზმები</u>

მეთაფლე ფუტკრის მიკრობული პათოსფერო ვირუსებით, ბაქტერიებით, სოკოებითა და უმარტივესებითაა წარმოდგენილი.

დასავლური მეთაფლე ფუტკრების პოპულაციებში ვირუსული პათოგენების გამრავალფეროვნება, აზიური მეთაფლე ფუტკრის *Apis cerana*– ს ბუნებრივი პარაზიტის *Varroa destructor*- ის გავრცელების არეალის ცვლილებებს უკავშირდება (Martin *et al*. 2012), რომლის მიერ გამოწვეული დიდი მასშტაბის ეკონომიკური ზარალის სტატისტიკა ინდუსტრიულ მეფუტკრეობაში მეოცე საუკუნის ოთხმოციანი წლებიდან ფიქსირდება (S. G. Potts *et al*. 2009); თუმცა ფუტკრის კოლონიების მოკვდინება ტკიპასთან ერთად, მასთან ასოცირებული ვირუსული პათოგენების აქტივობასაც უკავშირდება და, არსებული ჰიპოთეზის თანახმად, შესაძლოა უფრო მეტი ზიანის მომტანიც კი იყოს, ვიდრე თავად ტკიპა (Shen *et al*. 2005).

ვირუსების მიერ გამოწვეული ციტოპათოლოგიური ცვლილებები კოლონიის წევრების სიცოცხლისუნარიანობაზე აისახება. გარდა მორფოლოგიური დაზიანებებისა, ფუტკრებს, შესაძლოა, შეეცვალოთ ქცევითი თავისებურებებიც (Fujiyuki *et al*. 2004; Iqbal and Mueller 2007), რაც შემდგომში ფუტკრის კოლონიის ფუნქციონირებას შეუძლებელს ხდის.

Apis mellifera–ს ვირუსული პათოგენების აღმოჩენა, მათი შესწავლის მოლეკულური ბიოლოგიის მეთოდების განვითარებასთან ერთად გრძელდება. დღეისათვის ცნობილია, რომ ფუტკრების ვირუსული პათოგენების ძირითად ჯგუფს დადებით ჯაჭვიანი რნმ ვირუსები წარმოადგენენ Dicistroviridae და Iflaviridae- ს ოჯახიდან, ასევე ცნობილია ახალი Nodaviridae- ს ჯგუფის

პოტენციური კანდიდატი ვირუსები (Runckel *et al*. 2011). ფუტკრებში აღმოჩენილი ვირუსების მხოლოდ მცირე ნაწილია დნმ ვირუსი (Clark 1978), თუმცა მათი განსაკუთრებული როლი კოლონიების კოლაფსის ფენომენის (CDD) განვითარებაში დადასტურებული არ არის.

ცხადია, რომ ფუტკრის ვირუსები ნეგატიურ გავლენას ახდენენ მასპინძლის ფიზიოლოგიურ, მორფოლოგიურდა ქცევით თავისებურებებზე და ხელს უწყობენ ფუტკრების კოლონიების დასუსტებასა და მოკვდინებას (Genersch and Aubert 2010; Van Engelsdorp *et al*. 2009). ვირუსულ დაავადებებთან გამკლავების სტრატეგია დღესდღეობით მეფუტკრეობაში დაავადებათა კონტროლის ინტეგრირებულ მენეჯმენტზეა აგებული, რაც, პირველ რიგში, საარსებო გარემოს გაუმჯობესებასა და ვირუსების გამავრცელებელი პარაზიტების კონტროლს გულისხმობს (A. P. A. Moore, Wilson, and Skinner 2015). პირდაპირი ანტივირუსული მოქმედების პრეპარატების გამოყენების პრაქტიკა მეფუტკრეობაში ჯერჯერობით შემუშავებული არ არის.

ბაქტერიული დაავადებები ვირუსული დაავადებებისგან განსხვავებით, მეთაფლე ფუტკარში მოკრძალებული რაოდენობითაა წარმოდგენილი. მათ შორის განსაკუთრებით საშიშია ამერიკული და ევროპული სიდამპლე, რომელიც შესაბამისად გამოწვეულია *Paenibacillus larvae* და *Melissococcus plutonius*-ის მიერ.

ამერიკული სიდამპლის შემთხვევაში ფუტკრის დახურული ბარტყი (ჭუპრი) ინფიცირდება, რაც ართულებს მისი სპორაწარმომქმნელი აღმძვრელის კოლონიიდან ერადიკაციას. ევროპული სიდამპლის შემთხვევაში კი დაავადების ამთვისებელი ღია ბარტყია (ლარვა), რაც დაავადების კონტროლს აადვილებს (Genersch 2010; Forsgren 2010).

აღნიშნულ ბაქტერიულ დაავადებებთან ბრძოლისთვის აშშ-სა და არაევროპულ ქვეყნებში ანტიბიოტიკოთერაპიას მიმართავენ, რაც მეფუტკრეობის პროდუქტებში ანტიბიოტიკების ნარჩენების მოხვედრის რისკსა და გარემოში ანტიბიოტიკორეზისტენტულობის განმაპირობებელი გენების აკუმულაციის საფრთხეს ზრდის (Jay D. Evans 2003).

მუშა ფუტკრის იმაგოს ფორმები მიკოპლაზმური ბაქტერიული პათოგენების -*Spiroplasma apis*და *Spiroplasma melliferum*- ის მიმართ არიან მგრძნობიარენი (Meeus, Vercruysse, and Smagghe 2012), რომლებიც, შესაბამისად, „მაისის დაავადებასა" და სპიროპლაზმოზს იწვევენ. ორივე პათოგენი სისტემურ ინფექციას ფუტკრის ჰემოლიმფაში იწვევს. სპიროპლაზმების მასპინძლების სპექტრი საკმაოდ ფართო აღმოჩნდა და აქვაკულტურებშიც პრობლემურ საკითხადაა ქცეული. ჩატარებული კვლევების თანახმად, ამ ბაქტერიების ვირულენტობა მასპინძელზე მოქმედი სტრესულ ფაქტორებთანაა დაკავშირებული.

მიკროსპორიდიებიდან მეთაფლე ფუტკრის იმაგოს ფორმებში ორი მიკროორგანიზმი პარაზიტობს: *Nosema apis* და *Nosema ceranae*. ბოლო

ათწლეულში მიკროსპორიდიები ტაქსონომიური თვალსაზრისით სოკოების ჯგუფს მიაკუთვნეს (Adl *et al*. 2005). ორივე პარაზიტი ხშირად შერეულ ინფექციასაც იწვევს. ეს მიკროორგანიზმები შუა ნაწლავის ეპითელური ქსოვილის უჯრედშიდა პარაზიტებია. ინფექციის სიმძიმე მრავალი ფაქტორითაა ხოლმე განპირობებული, მათ შორის დიდ როლს თამაშობს სეზონური - ამინდთან დაკავშირებული პირობები, ფუტკრების რასობრივი კუთვნილება, კოლონიის მავნე ქიმიური ნარჩენებით დაბინძურება.

ნოზემოზით კოლონიების მასიურად დახოცვის ფაქტების შესახებ მსოფლიოს სხვადასხვა წერტილებიდან არაერთგვაროვანი მონაცემები არსებობს. ფუტკრის კოლონიების განსაკუთრებით მასშტაბური განადგურება ესპანეთში ფიქსირდებოდა (Higes *et al*. 2008), რაც პარაზიტის მიმართ ენდემური ფუტკრის ჯიშების დაბალი რეზისტენტობით აიხსნება.

სოკოვანი დაავადებებიდან ფუტკრებში ცნობილია ფუტკრის ლარვების ასპერგილოზი, რომელსაც ობის სოკოების ჯგუფის წარმომადგენლები *Aspergillus niger, Aspergillus flavus, Aspergillus nomius, Aspergillus phoenicis* (Foley *et al*. 2014) იწვევენ.

ჩაკირულ ბარტყს - ასკოფეროზს კი Ascosphaeraceae- ს ოჯახის წარმომადგენლებიდან *Ascosphaera apis* იწვევს; თუმცა, შესაძლებელია კოინფექციის სახით *Ascosphaera atra*- ს ჩართვა, რაც ლარვების სიკვდილიანობის დაჩქარებას ახდენს (Vojvodic *et al*. 2012). ასკოფეროზისა და ასპერგილოზის განვითარება გაზაფხულის გრილ და ტენიან სეზონს უკავშირდება ხოლმე. დაავადებათა აღმძვრელების სპორები ხვდებიან ლარვების საჭმლის მომნელებელ ტრაქტში და შინაგან ორგანოებში აგრძელებენ გამრავლებას. სპორწარმოქმნა კი ლარვის ზედაპირზე ხდება (Aronstein and Holloway 2013), რაც მიკროორგანიზმის გარემოში წარმატებულ გავრცელებას უწყობს ხელს.

ვარაუდობენ, რომ ამ ორი სოკოვანი დაავადების მიმართ მხოლოდ ლარვების მგრძნობელობა, ზრდასრული ფორმების მხრიდან კი რეზისტენტობა ორ მიზეზს: იმაგოს ფორმებში ჩამოყალიბებულ მდგრად სიმბიოტურ მიკროფლორასა და იმუნური სისტემის განსხვავებულ თავისებურებებს უკავშირდება (Jay D. Evans and Schwarz 2011).

არსებობს დაავადებათა ეგზოტიკური ფორმებიც, რომლებსაც დიდი ხნის მანძილზე შემდეგი მიზეზების გამო ვერ ადგენდნენ; ესენია: შეუმჩნეველი სიმპტომები, მიკროსკოპიის შეზღუდული შესაძლებლობები, გავრცელების იშვიათი შემთხვევები, პათოგენის გამოყოფასა და ლაბორატორიულ პირობებში გამრავლებასთან დაკავშირებული სირთულეები, მასპინძლის სიკვდილის შემდგომ პათოგენის სწრაფი დეგრადაცია და გენეტიკური მარკერების არარსებობა (Jay D. Evans and Schwarz 2011).

ამჟამად უკვე დადგენილია ფუტკრებში პროტისტების პარაფილური ჯგუფის წარმომადგენლების ტრიპანოსომატიდების სახეობები *Crithidia*

mellificae, Lotmaria passim (Schwarz, Ryan S., Gary R. Bauchan, Charles A. Murphy, Jorgen Ravoet, Dirk C. Graaf 2015). ფუტკრებში ასევე აღწერილია პროტისტების წარმომადგენლების, გრეგარინების მიერ გამოწვეული ინფექციების შემთხვევები. დადგენილია, რომ *Apicystis bombi* ფუტკრების ოჯახის სხვა წარმომადგელებში – ბაზებშიც ინფექციურ პროცესს იწვევს (Plischuk *et al*. 2011).

ზომიერ და ტროპიკულ სარტყელში ცნობილია *Malpighamoeba mellificae*-ს მიერ მეთაფლე ფუტკრების ინფიცირების შემთხვევები; მიკროორგანიზმის ცისტა მწერის მალპიგის მილაკებში მრავლდება და მისი ფუნქციების მოშლას იწვევს (Jay D. Evans and Schwarz 2011).

სავარაუდოდ, *Apis mellifera*– ს მიკრობული პათოსფერო კიდევ უფრო გაფაროვდება, რაც დეტექციის მეთოდების დახვეწითა და ახალი, რეკომბინანტი მიკროორგანიზმების სწრაფი ევოლუციის შესაძლებლობით იქნება განპირობებული. ფუტკრების პოპულაციებში თანამედროვე უარყოფითი ეკოლოგიური ფაქტორებით პროვოცირებული იმუნური ფონის რეგრესი მათთვის უჩვეულო პათოგენების მიმართ ამთვისებლობის ერთ-ერთ ხელსაყრელ პირობადაც კი შეიძლება იქცეს.

2.3 *Apis mellifera* – ს იმუნური სისტემის თავისებურებანი

Apis mellifera–ს იმუნური სისტემის თავისებურებები აქტიური შესწავლის საგანს წარმოადგენს. ფუტკრის იმუნური სისტემის ფორმირება ლარვის გამოჩეკის პერიოდიდან იწყება. ზოგადად, მწერების იმუნური სისტემა უცხო აგენტზე მრავალი სახის არასპეციფიური საპასუხო რეაქციის უნარით ხასიათდება.

მწერების ნაწლავურ ტრაქტში არსებული ეპითელი, ანტიმიკრობული სეკრეტები, მიკრობების მიმართ აგრესიული გარემოს ქმნიან, რაც მათ დაცვას უზრუნვეყოფს.პირველადი ბარიერების გადალახვის შემდეგ მიკროორგანიზმებს უჯრედულ და ჰუმორულ დამცველობით მექანიზმებთან უწევთ შეხვედრა.

ფეხსახსრიანებში იმუნური პასუხი ფაგოციტოზის, მელანიზაციის, ექსტრაუჯრედული მატრიქსისა და ანტიმიკრობული პეპტიდების სინთეზის, პათოგენების ფერმენტული დაშლის უნარების, დეტექტორი მოლეკულების, პროაპტოზური მოლეკულებისა და ციტოკინების არსებობას ემყარება (Hoffmann 2003).

ფეხსახსრიანებში კარგად არის შესწავლილი ბაქტერიული, ვირუსული და სოკოვანი აგენტების შეჭრის საპასუხოდ განვითარებული ენზიმ ფენოლოქსიდაზას ინდუქციისა და მის მიერ ინიცირებული რთული

დამცველობითი კასკადის მექანიზმები (González-Santoyo and Córdoba-Aguilar 2012).

ფუტკრების თავდაცვით სტრატეგიაში ინფექციური აგენტის შეცნობისა და საპასუხო რეაქციათა მრავალი სასიგნალო გზაა ჩართული. მათ შორის კარგადაა შესწავლილი უჯრედშიდა სიგნალების ტრანსდუქციასა და ანტიმიკრობულ საპასუხო რეაქციებში Imd დაToll რეცეპტორ დამოკიდებული გზები (Katherine Aronstein 2005), რომელთა აქტივაციაშიც NF-kB ტრანსკრიფციის უნივერსალური ფაქტორის ფუნქციური დატვირთვა ისეთივეა, როგორც ძუძუმწოვრების შემთხვევაში (Hoffmann 2003; Osta *et al*. 2004).

მწერის ორგანიზმში მიკროორგანიზმის მოხვედრას მის ცხიმოვან სხეულში მცირე მოლეკულური მასის, ანტიმიკრობული კათიონური პეპტიდების მყისიერი სინთეზი ახლავს, რომელიც ცირკულაციაში ხვდება და პათოგენის განადგურებაში მონაწილეობს (Y.P. Wang and Lai 2010) .

მასპინძლის ორგანიზმზე მიკროორგანიზმების მოქმედებას მეცნიერები სხვადასხვა მიდგომებით აკვირდებიან: შესაძლებელია მწერის ჰემოლიმფაში ანტიმიკრობული პეპტიდების კონცენტრაციის განსაზღვრა (Gätschenberger *et al*. 2013), ასევე რეალურ დროში პჯრ ტექნიკის გამოყენებით იმუნური ფაქტორების მაკოდირებელი გენების ექსპრესიის შეფასება (Jay D Evans and Lopez 2004).

Apis mellifera – ს გენომის კვლევისას აღმოჩნდა, რომ იმუნურ პასუხში მონაწილე გენების რაოდენობა (Weinstock 2006) არასოციალურ მწერებში არსებული იგივე ჯგუფის გენების რაოდენობის მესამედს წარმოადგენს (J. D. Evans et al. 2006). მეცნიერთა აზრით, ამ გენების დეფიციტი მეთაფლე ფუკრებში დამატებითი - სოციალური იმუნური სისტემის არსებობით კომპენსირდება (Cremer, Armitage, and Schmid-Hempel 2007), რაც კოლონიის წევრების ერთობლივი ქცევითი თავისებურების დაავადებებისგან თავის დასაცავად კოოპერირების შესანიშნავ მაგალითებზეა შესწავლილი (Wilson-Rich *et al.* 2009).

სოციალური მწერებში ინფექციის გამოწვევის ალბათობას მასპინძლის სოციალურ-ჰიგიენური ქცევა (დაავადებული ინდივიდების კოლონიიდან მოცილება, დინდგელის შეგროვება და ბუდის ზედაპირების დაფარვა) ამცირებს (Rauch *et al*. 2009). მეორეს მხრივ, ასეთ პირობებში მიკროორგანიზმებისათვის გარკვეული უპირატესობებიც არსებობს: მიკროორგანიზმთა თაობიდან თაობაში ან კოლონიის ერთი თაობის წევრებს შორის ,ტრანსმისიის დიდი ალბათობა კოლონიის წევრების სერიული დაინფიცირების შემთხვევაში, ინფექციურ აგენტებს შესაძლებლობა ეძლევათ, „გაეცნონ" მასპინძლის პროტეომის პროფილს და საკუთარი მუტაციური უნარების ამოქმედებით სწრაფად და უფრო ეფექტურად ადაპტირდნენ მის ფიზიოლოგიურ თავისებურებებთან (Jay D. Evans and Schwarz 2011).

ეს თეორია, ვირუსული პათოგენების მაგალითზე, მოლეკულური გენეტიკის მეთოდების საშუალებით მტკიცდება, სადაც ჩანს, რომ ვირუსები რეკომბინაციის სწრაფი უნარით გამოირჩევიან (Palacios *et al*. 2008); შესაძლოა, რეკომბინაცია ვირულენტობის შეძენის გზადაც კი იქცეს (J. Moore *et al*. 2011).

ფუტკრების იმუნური სისტემის სტატუსის მაჩვენებლის მერყეობა მრავალი ფაქტორითაა განპირობებული.

მაგალითად, გამოზამთრებისას ენერგიის დაზოგვის მიზნით, მეტაბოლიზმის შეფერხება იმუნური ფაქტორების მაკოდირებელი გენების ექსპრესიას ამცირებს, რასაც ნეგატიური შედეგები არ მოჰყვება. ამ დროს მიკრობული ინფექციების რისკი ძალზედ დაბალია; თუმცა არსებობს ერთი გარემოება, რომელიც ამის საპირისპიროდ მეტყველებს. კერძოდ, ბოლო ათწლეულებში ფუტკრის პარაზიტი ტკიპას - *Varroa destructor* - გავრცელების არეალი გაფართოვდა და მის მიერ ვირუსული პათოგენებით ფუტკრების ინფიცირების მუდმივი რისკი გაიზარდა (Steinmann *et al*. 2015), ვინაიდან ეს ტკიპა ფუტკრის კოლონიის წევრებზე პარაზიტიზმს გამოზამთრების დროსაც განაგრძობს.

თავად მწერების ექტოპარაზიტების (მაგ. *Varroa destructor*) სტრატეგია, გაუძლონ მასპინძლის დამცავ მექანიზმებს და მოახერხონ გამრავლება, სწორედ მასპინძლის იმუნური სისტემის მოშლაზეა ორიენტირებული. იმუნოსუპრესიის ფონზე კი ფუტკრებში ვირუსული დაავადებების განვითარებისთვის ხელსაყრელი გარემო იქმნება (Yang and Cox-Foster 2005).

სოფლის მეურნეობაში პესტიციდების უხვად გამოყენებას შედეგად ფუტკრის კოლონიებში მათი აკუმულაცია მოჰყვება, ეს კი, თავის მხრივ, მათი ტოკსიკური ეფექტის გამოვლენას განაპირობებს. დადგენილია, რომ პესტიციდებით დაბინძურებული კოლონიები უფრო მეტად მოწყვლადნი არიან . ცერანაე-ის სპორებით ინფიცირების მიმართ, რასაც ასევე იმუნოსუპრესიის ეფექტს მიაწერენ (J. Y. Wu *et al.* 2012; Pettis *et al.* 2012).

ცხადია, მეთაფლე ფუტკრებში იმუნური სისტემის ჰომეოსტაზის დაცვა ამ მწერის პოპულაციის დაცვის ერთ-ერთი უმნიშვნელოვანესი საფუძველია. იმუნური სისტემის მოდულაციის მრავალი ხერხი არსებობს, რაც ხშირად სინთეზური ქიმიური შენაერთების გამოყენებასაც გულისხმობს. თუმცა არსებობს იმუნური სისტემის მართვის ბუნებრივი მექანიზმები, რომელთა რესურსიც სრულყოფილად გამოყენებული არ არის.

განსაკუთრებული ადგილი ფუტკრების იმუნური სისტემის ფორმირებასა და ფუნქციონირებაში ნაწლავურ მიკროფლორას უკავია, რომელიც იმუნური სისტემის დანამატად (Extended Immune Phenotype) (Koch and Schmid-Hempel 2011) არის მიჩნეული.

არსებული მოსაზრებით, მაკროორგანიზმის იმუნური სისტემის საპასუხო რეაქციაზე, პათოგენი და სიმბიონტი მიკროორგანიზმები განსხვავებულად რეაგირებენ. ძუძუმწოვრების კომენსალი ბაქტერიის -

Bacteroides fragilis - მაგალითზე დადგენილია, რომ მასპინძლის ნაწლავური ტრაქტის ლორწოვანი გარსების ზედაპირების კოლონიზაციისას, ეს მიკროორგანიზმი Toll რეცეპტორებთან კომუნიკაციისას სიმბიოტურ ფაქტორს პოლისაქარიდ A (PSA) იყენებს (TLR ლიგანდების ახლად აღწერილი ჯგუფი), რასაც მასპინძლის იმუნოტოლერანტულ რეაქციამდე მივყავართ. სხვა სიტყვებით, კომენსალი ბაქტერია Toll სასიგნალო გზას იმუნოსუპრესიისთვის იყენებს. პათოგენი მიკროორგანიზმის TLR2 ლიგანდები კი ამას, როგორც წესი, ვერ ახერხებენ. ამ კვლევის ავტორების (რაუნდი და სხვ.) აზრით, იმუნურ სისტემას პათოგენისა და კომენსალი მიკროორგანიზმების ერთმანეთისგან გარჩევა შეუძლია, თუმცა ეს ფენომენი, ავტორის აზრით, მეტწილად ბაქტერიის მიერ განვითარებული უნარია, მოიპოვოს მასპინძლის ტოლერანტული დამოკიდებულება (June L Round *et al*. 2011).

ეგზოგენური - ფერმენტციისას მიღებული საკვები - პროდუქტებიდან გამოყოფილი რძემჟავა ბაქტერიებით ფუტკრებში ჩატარებული ცდებით დადგინდა, რომ ისინი მასპინძლის იმუნური ტრასკრიპტომის მოდულაციას იწვევენ (Yoshiyama *et al*. 2013; Jay D Evans and Lopez 2004).

ამ თვალსაზრისით უფრო საინტერესო და აქტუალურია ენდოგენური მიკროფლორის იმუნომოდულაციური მოქმედების ცოდნა, რაც არ არის შესწავლილი და რისი შეფასებაც ჩვენი კვლევის ერთერთ საგანს წარმოადგენს.

2.4 მიკრობულ დაავადებათა კონტროლის კონვენციური მიდგომა მეფუტკრეობაში და მისი ნაკლოვანებები

ინდუსტრიული მეფუტკრეობა მიკრობებით გამოწვეული დაავადებებისგან ყოველწლიურად დიდ ზარალს იღებს. პის მელლიფერა –ს მიკრობული პათოსფეროს პორტრეტი, ინფექციურ დაავადებათა დეტექციის მოლეკულური ბიოლოგიის მეთოდების დახვეწასთან ერთად მრავალფეროვანდება (Runckel *et al*. 2011; Singh *et al*. 2010).

ფუტკრის ინფექციურ დაავადებებთან ბრძოლის არსებული სტრატეგია პრაქტიკული მეფუტკრეობის ზოოტექნიკური მეთოდების დაცვასა და დაავადებათა კონტროლს გულისხმობს, რაც მრავალი ტიპის ფარმაკოლოგიური საშუალებების გამოყენებით ხორციელდება.

მიკრობულ დაავადებებს ეტიოლოგიური სპეციფიკის გათვალისწინებით ანტიბაქტერიული, ფუნგიციდური და/ან ანტივირუსული საშუალებებით ებრძვიან.

ბაქტერიული დაავადებების – ამერიკული და ევროპული სიდამპლეების შემთხვევაში, ანტიბიოტიკების გამოყენების პრაქტიკა გასული საუკუნის 60-იან წლებში დაინერგა და დღემდე არსებობს. ამ მიზნით გამოყენებული ანტიბიოტიკების რაოდენობა ათეულებს მოითვლის, თუმცაღა

მათი გამოყენების სიხშირე და არჩევანი კონკრეტული ქვეყნისა თუ რეგიონის მეფუტკრეობის ტრადიციებსა და ვეტერინარულ-სანიტარული საკანონმდებლო სივრცის თავისებურებებზეა დამოკიდებული.

ევროკავშირის სივრცეში, მეთაფლე ფუტკრები საკვები პროდუქტის მწარმოებელი ცხოველებადარიან აიარებულნი; ამდენად, მეფუტკრეობის პროდუქტებში ფარმაკოლოგიური საშუალებების კონცენტრაციის დასაშვები ნორმები განსაზღვრულია.

ვინაიდან, სკიდან და ფუტკრის პროდუქტებიდან ანტიბიოტიკების ელიმინაციის პერიოდი დადგენილი არ არის, მათი ვეტერინარული ავტორიზაცია მეფუტკრეობაში გამოსაყენებლად ნულოვანი ტოლერანტობის მიდგომით განისაზღვრა ანუ მათ მეფუტკრეობაში არ იყენებენ (Residue 2009). 2009

წლის იანვრიდან სტრეპტომიცინის, ტეტრაციკლინისა და სულფონამიდის მიმართ თაფლში მათი ზღვრული დოზების განსაზღვრა შვეიცარიაშიც შეწყვიტეს. მათ ნებისმიერი რაოდენობით აღმოჩენას პროდუქტში მისი წუნდება მოჰყვება. გაერთიანებულ სამეფოში დასაშვებია ოქსიტეტრაციკლინით ევროპული სიდამპლის მკურნალობა, თუმცა ასეთი კოლოიებიდან პროდუქტის მიღება 6 თვის განმავლობაში იკრძალება. საფრანგეთში კი გამონაკლისს შეადგენენ კოლონიები, რომელთაც ამ დაავადებათა მხოლოდ მცირე სიმპტომები აღმოაჩნდებათ. მათ ანტიბიოტიკებით მკურნალობენ, რის შემდეგ კი უნდა მოხდეს ბუდის სრული განახლება და ძველი ჩარჩოების განადგურება.

განსხვავებული ვითარებაა ამერიკის შეერთებულ შტატებში, სადაც ამჟამადაც იყენებენ ოქსიტეტრაციკლინს, თილოზინსა და ფუმაგილინს, თუმცა იმ პირობით, რომ ანტიბიოტიკოთერაპიის დროს ღალიანობა არ მიმდინარეობს და თაფლში ნარჩენების არსებობა არ აღინიშნება. კანადასა და ინდოეთში ამერიკული და ევროპული სიდამპლეების სამკურნალოდ მხოლოდ ოქსიტეტრაციკლინია დაშვებული (Reybroeck *et al*. 2012).

სხვადასხვა ქვეყნებიდან აღებული თაფლის ნიმუშებში აღმოჩენილი ანტიბიოტიკებით დასტურდება მათი გამოყენების არაკორექტული შემთხვევები (Vidal *et al*. 2009; Ortelli, Edder, and Corvi 2004; Kaufmann and Kaenzig 2004). მსგავსი მდგომარეობაა საქართველოშიც. სოფლის მეურნეობის სამინისტროს სურსათის უვნებლობის სააგენტოს მიერ მეფუტკრეობაში ჩატარებული კვლევა, ანტიბიოტიკების უკონტროლო და არარაციონალურ გამოყენებაზე მიანიშნებს (ქართული თაფლის ნიმუშების ლაბორატორიული კვლევა 2014).

გამოყენებული ანტიბიოტიკების ფუტკრის კოლონიაში მოხვედრისას მათი ელიმინაციისა და დეგრადაციის დინამიკა ლინკომიცინის, თილოზინის, ერითრომიცინის, ქლორამფენიკოლისა და ამპიცილინის მაგალითზეა შესწავლილი. შედეგები აჩვენებს, რომ ეს ანტიბიოტიკები თაფლში

ადმინისტრირებიდან მინიმუმ 14 დღის და მაქსიმუმ ერთი წლის განმავლობაში ნარჩუნდება (Reybroeck *et al*. 2012).

სუსტი ვეტერინარულ-სანიტარული კონტროლის პირობებში ანტიბიოტიკების გამოყენების სიხშირე ძალიან მაღალია. საკითხს ართულებს ვეტერინარულ აფთიაქებში ადვილად ხელმისაწვდომი ანტიბიოტიკების დიდი არჩევანიც. საკმარისია რიფამპიცინის საფუძველზე შექმნილი პრეპარატის ბაქტოპოლის მაგალითად მოყვანა. აღნიშნული პრეპარატი, ჩვეულებრივ, ადამიანებში ტუბერკულოზის სამკურნალოდ გამოიყენება.

დასავლური ქვეყნებისა და ჩრდილოეთ ამერიკის კონტინენტის შემთხვევაშიც, გასულ საუკუნეში, ანტიბიოტიკების გამოყენების მსგავსი სტიქიური და რუტინული პრაქტიკა აღინიშნებოდა. ყოველივე ეს გარემოში აისახა, კონკრეტულადად ფუტკრებში ბინადარ ბაქტერიებს შორის ანტიბიოტიკორეზისტენტული შტამების გავრცელებით აღნიშნა.

ანტიბიოტიკების ბაქტერიოციდული მექანიზმები მიკრობიოტის ბაქტერიებზეც ვრცელდება, რაც მისი სახეობრივი და რაოდენობრივი შემადგენლობის არაბუნებრივი ცვლილების მიზეზი ხდება. ამას ჰოლოგენომის ჰომეოსტაზის მოშლამდეც მივყავართ (Schwarz, Huang, and Evans 2015). ანტიბიოტიკორეზისტენტული გენების ევოლუცია და აკუმულირება არა მხოლოდ პათოგენ მიკროორგანიზმებში, არამედ მიკრობიოტის წარმომადგენლებს შორისაც მიმდინარეობს. ანტიბიოტიკორეზისტენტობის განმსაზღვრელი გენეტიკური ფაქტორების ტრანსფერულობის შესაძლებლობა პრობლემას კიდევ უფრო მეტად ამწვავებს (Tian *et al*. 2012; Levy and Marshall 2013).

მსგავსი რეგულაციები მოქმედებს ფუნგიციდური პრეპარატების შემთხვევაშიც. ფუმაგილინის გამოყენება, ნოზემატოზის სამკურნალოდ ევროკავშირის ქვეყნებში აკრძალულია, თუმცა ნებადართულია აშშ-სა და დიდ ბრიტანეთში. ბოლოდროინდელი კვლევების მონაცემების თანახმად ამ ქიმიურ ნაერთს გენოტოქსიკური (Kulic *et al*. 2009) და ციტოტოქსიკური (Stanimirovic *et al*. 2007) ეფექტი აქვს, რაც, სავარაუდოდ, მისი გამოყენების შესაძლებლობის გადახედვას გამოიწვევს.

მეფუტკრეობაში ვირუსული დაავადებების სამკურნალოდ გამოსაყენებელი ეფექტური საშუალება, ამჟამად ოფიციალურად არც ერთ ქვეყანაში არ არის რეკომენდებული.

მიკრობულ დაავადებათა საკონტროლო ღონისძიებების ასეთ შეზღუდვას და გართულებებით დატვირთული შესაძლებლობების არსებობას ალტერნატიული გზების ძიებისკენ მივყავართ.

2.5 მიკრობული რესურს-მენეჯმენტი – მეთაფლე ფუტკრის ეკოსისტემის გაჯანსაღების პერსპექტიული მიმართულება

მიკრობული რესურს-მენეჯმენტი (MRM) (Verstraete et al. 2007) მაკროორგანიზმების ჯანმრთელობის დაცვისა და პროდუქტიულობის გაზრდისთვის მიკროორგანიზმების უსაფრთხო გამოყენებას გულისხმობს. MRM – ის კლასიკური ნიმუში მედიცინაში პრობიოტიკური პრეპარატების გამოყენებაა.

პრობიოტიკის საერთაშორისო დონეზე მიღებული ზოგადი განმარტების თანახმად, პრობიოტიკად მიიჩნევა ცოცხალი მიკროორგანიზმი, რომელიც შესაბამისი დოზით დანიშვნის შემთხვევაში, დადებით ეფექტს მოახდენს მასპინძლის ჯანმრთელობაზე.

მეტი სიზუსტისთვის, მეცნიერები პრობიოტიკებს მათი მოქმედების მექანიზმის, მოქმედების ადგილის, ადმინისტრირების გზისა და ხასიათის მიხედვით არჩევენ. აქედან გამომდინარე, პრობიოტიკური პრეპარატი მასპინძლის სახეობას, ასაკსა და მის ფიზიოლოგიურ მდგომარეობაზე უნდა იყოს მორგებული (Sanders 2008).

პრობიოტიკური პრეპარატის კონსტრუირებისას მიკროორგანიზმების შერჩევა , როგორც ენდოგენური, ისე ეგზოგენური ბაქტერიული ფლორიდან შეიძლება განხორციელდეს (Sanders 2006).

ენდოგენური მიკროფლორა, როგორც წესი, მასპინძლის საჭმლის მომნელებელ ტრაქტში ბინადარი დამახასიათებელი ბაქტერიული სახეობებისგან შედგება.

ეს სახეობები კონკრეტულ საარსებო გარემოს არიან შეგუებულნი და მორგებულნი, რომელიც, ერთი შეხედვით, მკაცრადაც კი შეიძლება მოგვეჩვენოს. საჭმლის მომნელებელი ტრაქტის მიკროგარემო დაბალი მჟავიანობით ხასიათდება, ასევე აქ შეზღუდულია ჟანგბადის რაოდენობა; საკვები ნივთიერებების ნაირფეროვნებაც ძალზედ სპეციფიურია. მაგალითად, ფუტკრების შემთხვევაში, საკვები ნივთიერებები მხოლოდ ორი სახის პროდუქტით შემოიფარგლება, ესენია: თაფლი, რომელიც ენერგიის წყაროს წარმოადგენს და აზოტით მდიდარი საკვები - ყვავილის მტვერი (Nicolson 2011).

მიუხედავად იმისა, რომ ენდოგენური მიკროფლორა, მაპსინძელს ბუნებრივად ახასიათებს, მისგან გამოყოფილი მიკროორგანიზმების კულტივარები მათ სათანადო დახასიათებამდე პრობიოტიკებად მაინც ვერ ჩაითვლება (Sanders 2008).

პრობიოტიკების მიმართ ზოგადი მიდგომა კვლევის მეთოდების დახვეწისა და გაღრმავების ფონზე სწრაფ ცვლილებებს განიცდის. კანდიდატი პრობიოტიკი ბაქტერიების გამოსავლენად დადგენილი კრიტერიუმებიც, როგორც წესი, ამ ბაქტერიების გამოყენებისთვის დაგეგმილი პროფილის,

დანიშნულების და მათ შესახებ ასევე ახალი დეტალების გამოვლენის მიხედვით იცვლება.

ზოგადი და უცვლელი მოთხოვნის თანახმად, პრობიოტიკური პოტენციალის მქონე მიკროორგანიზმებმა მასპინძელ მაკროორგანიზმში მიმდინარე ფიზიოლოგიურ პროცესებზე დადებითი გავლენა უნდა მოახდინონ. ეს შეიძლება გამოიხატოს იმუნურ სისტემაში მიმდინარე პოზიტიურ ძვრებში, ეპითელური ზედაპირების კოლონიზაციისათვის კონკურენტულ ბრძოლასა და ანტიმიკრობული მეტაბოლიტების საშუალებით პათოგენური მიკროორგანიზმების დათრგუნვაში შეიძლება გამოიხატოს (Rolfe 2000; Salminen and van Loveren 2012).

როგორც უკვე აღვნიშნეთ, მეთაფლე ფუტკარი, სხვა ორგანიზმების მსგავსად, სხვადასხვა განზომილების თავდაცვითი მექანიზმებითაა აღჭურვილი. ერთ-ერთი მათგანი ნაწლავური მიკროფლორაა და ის მაკროორგანიზმის იმუნური სისტემის პოტენციურ მოდულატორად მიიჩნევა.

ეს იმას ნიშნავს, რომ სიმბიოტური მიკროორგანიზმების დახმარებით, მწერის სტრესული ფაქტორების მიმართ გამძლეობის ხარისხის გაზრდაა შესაძლებელი. ფუტკრის ნაწლავური მიკრობიოტის კვლევაც, სწორედ პრაქტიკულ მეფუტკრეობაში ამ ჰიპოთეზის გამოყენებადობის დადგენას ემსახურება.

ფუტკრებში, ისევე როგორც სხვა მრავალუჯრედიან ორგანიზმებში, ნაწლავური მიკროფლორის დიდი ნაწილი რძემჟავა ბაქტერიებითაა წარმოდგენილი. რძემჟავა ბაქტერიების ბიოქიმიური თვისებები ფართოდ გამოიყენება ბიოტექნოლოგიის სხვადასხვა განხრებში. მაგალითად, მათი პროტეოლიზური და ანტიმიკრობული პოტენციალი დიდი ხანია, რაც კვების ინდუსტრიასა (Savijoki, Ingmer, and Varmanen 2006) და მედიცინაში (Saxelin *et al*. 2005) გამოიყენება.

აღსანიშნავია, რომ ამ ჯგუფის ბაქტერიების ბიომრავალფეროვნება სპეციფიურია ყოველი ნიშისათვის. განსხვავებული ტიპის ნიშიდან გამოყოფილ ბაქტერიებს განსხვავებული ბიოქიმიური თვისებები გააჩნიათ. მაგალითად, რძემჟავა ბაქტერიების შედარებითი გენომიკის მონაცემებით, განსხვავებული ნიშის მიკროორგანიზმებში განსხვავებულ პროტეოლიზურ სისტემებს ავლენენ (Boekhorst *et al*. 2004), რომელთა გამოყენების პოტენციალიც ასევე სპეციფიურ გარემოშია შესაძლებელი.

ბაქტერიის (*bacillus*-გვარის) ენზიმური აქტივობის ამ თვისებას ყვავილის მტვრის ცილების წინასწარ პროტეოლიზს მიაწერდნენ. აცილლუს სუბტილის-ის მსგავსი თვისების ეფექტურობა და მისი სარგებლიანობა კრევეტების საკვების ამ ბაქტერიით წინასწარი დამუშავების მაგალითზე იქნა შესწავლილი, რამაც ასეთ პირობებში მომზადებული კრევეტების საკვების გაადვილებული მონელება განაპირობა (Liu *et al*. 2009).

უცნობია ფუტკრების ენდოგენურ რძემჟავა ბაქტერიებში ამილოლიზური სისტემების არსებობა. ამავე დროს კი ცნობილია, რომ მათი ცილოვანი საკვები – ყვავილის მტვერი სახამებელსაც შეიცავს (0% - 22%) (Human and Nicolson 2006), რომლის მონელების უნარიც ფუტკრების გარკვეულ კასტებს არ გააჩნიათ (Hrassnigg *et al*. 2005).

ბიოტექნოლოგიურ მეცნიერებაში რძემჟავა ბაქტერიების ფუნგიციდური თვისებისა და მისი ბიოპრეზერვაციული პოტენციალის შესწავლა ერთ-ერთი პერსპექტიული მიმართულებაა (Schnürer and Magnusson 2005).

ამ თვისების გამოყენება მიზანშეწონილი იქნებოდა ფუტკრის ბარტყის სოკოვანი დაავადებების: ასკოფეროზისა და ასპერგილოზის, ასევე ნოზემოზის კონტროლისთვის.

კანდიდატი პრობიოტიკი ბაქტერიების შესწავლისას განსაკუთრებულ ყურადღებას მიკრობული ანტაგონიზმის ფენომენი იწვევს. რძემჟავა ბაქტერიები გამოიმუშავებენ ისეთ ანტიმიკრობულ მეტაბოლიტებს, როგორიცაა: ორგანული მჟავები, წყალბადის ზეჟანგი, ნახშირორჟანგი, ეთანოლი, ბაქტერიოცინები (Ocaña and Elena Nader-Macías 2004).

გარდა მეტაბოლიტების ბიოქიმიურ მექანიზმებზე დაფუძნებული ანტაგონიზმისა, ის შესაძლოა სიმბიონტი ბაქტერიების კოაგრეგაციის უნარსაც ეყრდნობოდეს, როდესაც მათ მიერ პათოგენების შებოჭვა და შებოჭილ მდგომარეობაში მათი ნაწლავური ტრაქტიდან გამოდევნა ხდება (Collado, Meriluoto, and Salminen 2008).

რძემჟავა ბაქტერიების ამ საინტერესო თვისებების დანერგვის შესაძლებლობა მეფუტკრეობაში, კერძოდ ბაქტერიული დაავადებების წინააღმდეგ ბრძოლისთვის, მრავალმა კვლევამ დაადასტურა.

ამერიკული სიდამპლის გამომწვევის *Paenibacillus larvae*- ს წინააღმდეგ ფუტკრის ენდოგენური ბაქტერიების ეფექტურობა ექსპერიმენტულად დადგინდა (Forsgren *et al*. 2009). მსგავსი ეფექტურობა შეინიშნა ფუტკრის ევროპული სიდამპლის გამომწვევის *Melissococcus plutonius* შემთხვევაშიც (Endo and Salminen 2013; Vásquez *et al*. 2012).

ენდოგენური ბაქტერიების მიერ სოკოვანი დაავადების ასკოფეროზის გამომწვევი *Ascosphaera apis*-ს დათრგუნვის მაგალითი (Sabaté, Carrillo, and Carina Audisio 2009)

ამ მიკროორგანიზმების ანტიმიკრობულფართო სპექტრზე მიუთითებს, რაც ანტიბაქტერიულთან ერთად შესაძლო ფუნგიციდურ პოტენციალსაც მოიცავს.

მიკრობული რესურს მენეჯმენტი არა მხოლოდ ენდოგენური მიკროორგანიზმების გამოყენებას, არამედ ეგზოგენური – განსხვავებული ბიოლოგიური ნიშიდან გამოყოფილი სასარგებლო თვისებების მქონე მიკროორგანიზმების გამოყენებასაც გულისხმობს. ფუტკრის ბაქტერიული პათოგენების წინააღმდეგ ბაქტერიოცინების პროდუცენტი შტამების in vitro

და in vivo გამოცდამ მათი მაღალი ანტიმიკრობული ეფექტურობა აჩვენა (Yoshiyama *et al*. 2013; Jaouani *et al*. 2014).

მიკრობული რესურსის მენეჯმენტის მიმოხილვითი პუბლიკაციების შესწავლისას აღმოჩნდა, რომ ავტორებს მხედველობიდან გამორჩათ ფუტკრის ბაქტერიული დაავადებების კონტროლისთვის სხვა მიკროორგანიზმების, კერძოდ ბაქტერიოფაგების შესაძლო გამოყენება. ამერიკული სიდამპლის გამომწვევი პათოგენის *Paenibacillus larvae* ბაქტერიოფაგის *Paenibacillus larvae phage phiIBB_Pl23*-ის ენდოლიზინ - PlyPl23 კვლევამ (Oliveira *et al*. 2015) მიკრობული რესურსის მენეჯმენტის სივრცეში ახალი პერსპექტივები წარმოაჩინა.

სასარგებლო მიკროორგანიზმების მიკრობულ რესურს მენეჯმენტში ჩართვისათვის, პირველ რიგში, მათი გამოყოფა და შერჩევაა საჭირო, რაც ამ კულტივარების პოტენციური პრობიოტიკური თვისებების შესწავლით უნდა მოხდეს. პრობიოტიკური ფორმულების შექმნა სირთულეებთანაა დაკავშირებული, თუმცა მეთაფლე ფუტკრის დაავადებათა კონტროლის ალტერნატიული, ეკომეგობრული ბერკეტების შექმნის აუცილებლობა ასეთ კვლევას მიზანშეწონილს და დროულს ხდის.

თავი 3. ჰიპოთეზები და კვლევის მეთოდური მიდგომის შერჩევა

როგორც აღვნიშნეთ, კვლევის ერთ-ერთი მიზანი ფუტკრებიდან გამოყოფილი ენდოგენური ბაქტერიების პოტენციური პრობიოტიკური თვისებებისა და ეკოლოგიური თავისებურებების კვლევა იყო.

ვინაიდან, მეთაფლე ფუტკრები მათთან ასოცირებულ მიკროორგანიზმებს სპეციფიურ, ფრუქტოზით მდიდარ ნიშას სთავაზობენ, ამიტომაც ფრუქტოფილური რძემჟავა ბაქტერიების გამოყოფა და მათი შესწავლა დავგეგმეთ.

პირველ სამიზნედ მეთაფლე ფუტკრის მიკრობიოტის ჩიჩახვის ფილოტიპი ავირჩიეთ. ნავარაუდევია, რომ სწორედ ჩიჩახვის მიკრობიოტა პირველადი დაცვის ხაზის სახით უნიკალურ ბარიერს ქმნის, რაც გარემოდან ორგანიზმში მიკროორგანიზმებისა და ტოქსინების შეღწევას ზღუდავს (Olofsson and Vásquez 2008).

ჩიჩახვში სპეციფიური ბიოქიმიური გარემო იქმნება, რადგანაც ის შეგროვილი ნექტრისა და თაფლის სატრანსპორტო ორგანოა და ასევე ნექტრის თაფლად ქცევასა და ლარვების საკვების მომზადებაშიც მონაწილეობს. არსებული მოსაზრების თანახმად ჩიჩახვი კოლონიის წევრებს შორის მიკრობიოტის გამავრცელებელ რეზერვუარსაც წარმოადგენს (Vásquez *et al*. 2012).

მეორე სამიზნედ კი ჭეო – ფუტკრის მიერ შეგროვილი ყვავილის მტვრის ფერმენტირებული მარაგი, რომლიდანაც ასევე ფრუქტოფილური რძემჟავა ბაქტერიების გამოყოფა დავგეგმეთ. არსებულ მონაცემებზე დაყრდნობით, ყვავილის მტვერი და ჭეო სოკოვანი მიკროორგანიზმების რეზერვუარსაც წარმოადგენს, ამიტომ მისი ნიმუშებიდან სოკოებიც გამოყოფა მიზანშეწონილად ჩავთვალეთ.

გამოყოფილი ბაქტერიული შტამების გენეტიკური იდენტიფიკაციისთვის საჭიროდ მივიჩნიეთ პოლიმორფული დნმ-ის უბნების შემთხვევითი ამპლიფიკაციის მეთოდი („RAPD- PCR'') და გამოვიყენეთ 16S რიბოსომული რნმ-ის გენის სექვენირება (Huey and Hall 1989).

სიმბიონტი ბაქტერიის მიერ მასპინძლის ორგანიზმზე დადებითი გავლენის მოსახდენად, მას, პირველ რიგში, მასპინძლის საჭმლის მომნელებელი ტრაქტის ეპითელური ზედაპირების კოლონიზაციის უნარი უნდა გააჩნდეს, რასაც კარგად გამოხატული ადჰეზიური თვისებებით უნდა ახერხებდეს.

Apis mellifera – ს მიერ ნექტრის თაფლის მარაგად ქცევისას ჩიჩახვიდან მისი მრავალჯერადი ასპირაცია და რეგურგიტაცია ხდება, რაც ჩიჩახვის კუნთების ძლიერი შეკუმშვა მოდუნების ხარჯზე მიმდინარეობს.

სავარაუდოდ, ნექტრის ასეთი ხშირი და ძლიერი ნაკადების მიერ ეპითელური უჯრედებიდან რეზიდენტი მიკროფლორის ჩამორეცხვას, მიკროორგანიზმები საკუთარი უჯრედის ჰიდროფობიური ზედაპირის

დახმარებით არიდებენ თავს. ამ ჰიპოთეზის გადამოწმება ნახშირწყალბად ჰექსადეკანით ჰიდროფობიურობის განსაზღვრის მეთოდით ვეცადეთ (Vinderola and Reinheimer 2003).

მწერების საჭმლის მომნელებელი ტრაქტი, ნაწლავური მუცინით დაფარული პერიტროფული მემბრანითაა ამოფენილი (Lehane 1997). მწერების ნაწლავური მუცინი ბიოქიმიური სტრუქტურით ძუძუმწოვრების მუცინის მსგავსია (P. Wang and Granados 1997). ამ თავისებურების გათვალისწინებით, ძუძუმწოვრების მიკრობიოტის შესწავლისთვის in vitro მოდელებიდან ლექტინ კონკანავალინ A– სთან აგლუტინაციის მეთოდზე შევაჩერეთ არჩევანი (Kim, Ogawa, and Adachi 2006), რასაც სავარაუდოდ მანოზასპეციფიური ადჰეზიის აღმოჩენის საშუალება უნდა მოეცა. მანოზასპეციფიური ადჰეზიის უნარი პათოგენ მიკროორგანიზმებსაც ახასიათებთ. ეს ფენომენი სიმბიონტ, კომენსალ და პათოგენ ბაქტერიებს შორის საარსებო ზედაპირების კოლონიზაციისთვის ბრძოლისას ვლინდება (Neeser *et al*. 2000).

ბაქტერიების ადჰეზიური თვისებების კვლევისას ხშირად ეხ ვივო - უჯრედული კულტურების მოდელებსაც იყენებენ, თუმცა ფუტკრებიდან მიღებული ნაწლავური ეპითელის უჯრედული ხაზები ჯერჯერობით არ არსებობს, ამიტომ ეუკარიოტულ უჯრედებთან ადჰეზიის უნარის შესასწავლად *Saccharomyces cerevisiae*– ს უჯრედების აგლუტინაციის მეთოდზე შევაჩერეთ არჩევანი. *S. cerevisiae*– ს უჯრედებს სხვა ეუკარიოტული უჯრედების მსგავსი ციტოჩონჩხი აქვს, ამიტომ ეს მოდელი ხშირად გამოიყენება როგორც ადჰეზიური თვისებების, ისე ციტოტოქსიკური ეფექტების შესასწავლად (Valdivia and Valdivia 2004).

ბაქტერიების მიერ შეძენილი ანტიბიოტიკორეზისტენტობის ფენომენი ის ნეგატიური ევოლუციური ნახტომია, რომლის პროვოცირებაც ანტიბიოტიკების არარაციონალური გამოყენების პრაქტიკას მოჰყვა. მიკროეკოსისტემის ანტიბიოტიკებით გაჯერების კარგი ინდიკატორები სწორედ ასეთი ნიშებიდან გამოყოფილი ბაქტერიები არიან (Levy and Marshall 2013; Mathur and Singh 2005).

ქართული მეფუტკრეობის პრაქტიკაში ამ მოსაზრების სისწორის გადამოწმებისთვის ჩემ მიერ გამოყოფილი ბაქტერიული შტამების ანტიბიოტიკორეზისტენტობის მაჩვენებლების დადგენა იყო საჭირო. ამისათვის მიკროგაზავების მეთოდის გამოყენება გადავწყვიტეთ, რაც ანტიბიოტიკორეზისტენტობის პროფილის ფენოტიპურ დონეზე გამოვლინისა და აღნიშნული შტამების ზრდის დათრგუნვისთვის საჭირო სხვადასხვა ტიპის ანტიბიოტიკების მინიმალური კონცენტრაციის დადგენის საშუალებას იძლევა.

გამოყოფილი ბაქტერიული შტამების შესაძლო პრობიოტიკური პოტენციალის შეფასებისთვის მათი ანტიმიკრობული, სოკოების მიმართ

ანტაგონისტური, პროტეოლიზური და ამილოლიზური შესაძლებლობების კვლევა დავგეგმეთ.

ბაქტერიული ანტაგონიზმის შესასწავლად აპრობირებული *in vitro* მოდელის გამოვიყენება ვცადეთ, რაც მიზნად ბაქტერიოცინოგენურობის დეტექციას ისახავდა. ცდისთვის ინდიკატორი შტამებად - *L. sakei subsp. sakei JCM 1157,* როგორც ბაქტერიოცინების მიმართ მგრძნობიარე შტამი, ასევე ფუტკრის ამერიკული სიდამპლის გამომწვევი *P. larvae* – ს ორი შტამი გამოვიყენეთ. „აგარის ღრმულში დიფუზიის" მეთოდი (Schillinger and Lücke 1989) ბაქტერიული ანტაგონისტური აქტივობის ხასიათის საფუძვლიანი გარჩევის საშუალებას იძლევა. ეს მეთოდი ამომწურავ პასუხს იძლება ანტიბაქტერიული აქტივობის გენეზის შესახებ, თუ რით არის ის გამოწვეული: ბაქტერიოცინებით თუ სხვა მეტაბოლიტებით, მაგალითად ორგანული მჟავებით ან წყალბადის ზეჟანგით. ამიტომაც, ცდის წარმართვისათვის სწორედ ეს მეთოდი იყო შერჩეული.

გამოყოფილი ბაქტერიების ჭეოს ნიმუშებიდან გამოყოფილი სოკოებისადმი ანტაგონისტური დამოკიდებულების გამოსავლენად როგორც კონვენციური მეთოდი (ორშრიანი აგარის მეთოდი) ჩავთვალეთ მიზანსეწონილად, ასევე ჭეოს ფერმენტაციის მოდელის სიმულირების მეთოდის შემუშავებაც დავგეგმეთ, რათა ბუნებრივთან მიახლოებულ პირობებში ბაქტერიებისა და სოკოების მიერ ერთი ნიშის დაკავებისას კონკურენციის დინამიკაზე დაკვირვება მოგვეხდინა. ცნობილია, რომ რძემჟავა ბაქტერიები სხვადასხვა სუბსტრატის ფერმენტაციისას გამომუშავებული ორგანული მჟავების და სხვა მეტაბოლიტების დახმარებით სუბსტრატზე მიკოზური ნაზარდების პრევენციას ახდენენ. ჩვენ მსგავსი ფენომენის არსებობა ყვავილის მტვრის სუბსტრატშიც ვივარაუდეთ.

პროტეოლიზური თვისებების დასადგენად რამდენიმე ტიპის მიდგომა მივიჩნიეთ მიზანშეწონილად. ბაქტერიების პროტეოლიზურ უნარზე დაკვირვებისათვის სამი ტიპის სუბსტრატის (რძის, ნატრიუმის კაზეინატისა და მონოფლორული ყვავილის მტვრის) გამოყენება დავგეგმეთ.

ამილოლიზური აქტივობის დასადგენად რძემჟავა ბაქტერიების ზრდისთვის ხელსაყრელ კომპოზიციურ ნიადაგში (MRS),

მონოსაქარიდების სახამებლით ჩანაცვლება გადავწვიტეთ.

ბაქტერიული შტამების იმუნომოდულატორული თვისებების კვლევისთვის ინ ვივო მოდელების გამოყენება მივიჩნიეთ მიზანშეწონილად; რაც ენდოგენური ბაქტერიების ფუტკრის ლარვების დიეტაში ჩართვასა და შემდგომ იმუნური რეაქციების მაკოდირებელი გენების ტრანსკრიპციაზე დაკვირვებას გულისხმობდა, რომელიც რეალურ დროში პჯრ ტექნიკის გამოყენებით შეიძლება შესრულდეს.

ფუტკრებში ენდოგენური ბაქტერიების ადმინისტრირებისთვის სპეციალურად ლარვული ფაზა შერჩევა იყო დაგეგმილი, ვინაიდან

მეტამორფოზის მიმდინარეობისას იმაგოს ფაზამდე მხოლოდ ლარვები იკვებებიან. მეფუტკრეობის პრაქტიკაშიც პრობიოტიკების გამოყენების ერთ-ერთ შესაძლო გზად სწორედ ამ ფაზაში მყოფი ინდივიდების პრობიოტიკური პრეპარატით დამუშავებას ვვარაუდობდით. ჩვენ ასეთი მანიპულაციით ახალ, დამატებით სტრესფაქტორს შევუქმნიდით ინდივიდებს. ვვარაუდობდით, რომ ასეთი მიკრობული სტრესი იმუნური სისტემის მხრიდან ისეთ საპასუხო რეაქციას მოგვცემდა, რომელსაც შემდგომ თავად მაკროორგანიზმი სასიკეთოდ გამოიყენებდა.

ენდოგენური ბაქტერიების ლარვების დიეტაში ჩართვას შესაძლოა გარკვეული რისკები ახლდეს თან. ასეთი ფორმით ენდოგენური ბაქტერიების ლარვებში ადმინისტრირების შემდგომ მეტამორფოზზე ან იმაგო ფორმების ფიზიოლოგიურ პერფომანსზე რაიმე დაკვირვება არ არსებობს. ჩვენ, ლარვებში იმუნური პასუხის შესწავლის პარალელურად იდენტური საცდელი ჯგუფების იმაგოს ფორმებამდე მიყვანა ვცადეთ. გადავწყვიტეთ გვეწარმოებინა მათი გამოჩეკვის სტატისტიკა, გაგვეგო გამოჩეკილი იმაგოს წონა და შეგვესწავლა მათი ოლფაქტორული პერფომანსი (აქტოვობა).

საარსებო გარემოს ხერხემლიანი და უხერხემლო ორგანიზმები ოლფაქტორული მგრძნობელობის დახმარებით აღიქვამენ, ასე ისინი ქიმიურ კვალს საკვების, წყვილების, ბუდისა და მტაცებლების აღმოსაჩენად იყენებენ (Touhara and Vosshall 2009). მეთაფლე ფუტკრებში ოლფაქტორული მგრძნობელობა მაღალ დონეზეა განვითარებული და მათ ცხოველმყოფელობაში გადამწყვეტი როლი აკისრია. დღეს ცნობილია, რომ ფუტკრები კოლონიის წევრებს შორის კომუნიკაციის და ინფორმაციის აღქმისთვის 50-ზე მეტ ფერომონსა და ქიმიური ნაერთს იყენებენ (Slessor, Winston, and Le Conte 2005). ოლფაქტორულ მგრძნობელობას ასევე გადამწყვეტი მნიშვნელობა აქვს თაფლოვანი მცენარეების ყვავილების სურნელის აღქმაში (Menzel and Greggers 2013). ცდის განმავლობაში მიღებული ჯგუფების ფუტკრის იმაგო ფორმების ოლფაქტორული მგრძნობელობის შესასწავლად და შესადარებლად ელექტროანტენოგრამის ჩაწერის მეთოდის გამოყენება დავისახეთ მიზნად (Schneider 1957).

ასევე დაიგეგმა ნოზემატოზით დაავადებულ ფუტკრებში 5 ენდოგენური ბაქტერიული შტამისაგან შემდგარი კანდიდატი პრობიოტიკური ნარევის გამოცდა და მისი ეფექტის შესწავლა დაავადების მიმდინარეობაზე. ამ ექსპერიმენტით *Nosema Ceranae* – ს და პრობიოტიკური ნარევის გამოყენების დროში განსხვავებული სქემების შესწავლას ვვარაუდობდით. კერძოდ, გვაინტერესებდა გაგვეგო, რა ეფექტი ექნებოდა ფუტკრებში: პრობიოტიკური ნარევის წინასწარ, *N. Ceranae* – ს სპორებით ხელოვნურ ინფექციამდე, კოინფექციის დროს ან პირიქით – ინფექციის შემდგომ გამოყენებას.

თავი 4. გამოყენებული მასალა და კვლევის მეთოდები

4.1 ფრუქტოფილური რძემჟავა ბაქტერიების გამოყოფა ფუტკრის კოლონიიდან

ზრდასრული მუშა ფუტკრების ინდივიდებისა და ყვავილის მტვრის ნიმუშები საქართველოს სხვადასხვა გეოგრაფიულ ზონაში მდებარე საფუტკრეებიდან მოვიპოვეთ. ნიმუშების ასაღებად შერჩეულ იქნა ნოზემოზის და ფუტკრის ბაქტერიული დაავადებების სიმპტომების არმქონე კოლონიები. ასეპტიკის წესების დაცვით, მუშა ფუტკრების მუცლის ღრუს გაკვეთის შემდგომ, მოხდა საჭმლის მომნელებელი ტრაქტიდან ჩიჩახვის სეპარაცია, მოთავსება და სუსპენზირება სტერილურ ფოსფატურ ბუფერში. ასევე მოხდა ყვავილის მტვრის ნიმუშების სუსპენზირება ამავე ფოსფატურ ბუფერში 1:10 (w/v).

ნიმუშების ბუფერში ჰომოგენიზაციის შემდგომ, მოვახდინე სუსპენზიის გადანაწილება, სელექციური არის (Lactic Bacteria Differential Agar (HIMEDIA - M1087) აგარის შემცველი პეტრის ფინჯნების ზედაპირებზე. სელექციური ნიადაგი შეიცავდა ფრუქტოზას, როგორც ნახშირწყლის ერთადერთ წყაროს, ინდიკატორად გამოყენებული იყო ბრომკრეზოლის ლურჯი, რაც ორგანული მჟავების წარმომქმნელი ბაქტერიული კოლონიების დეტექციის საშუალებას იძლეოდა. ასეთ ნიადაგზე გაზრდილი რძემჟავა ბაქტერიები ნიადაგს მოყვითალო ფერს სძენენ, რაც მათ მიერ ნიადაგის აციდოფიკაციითაა განპირობებული. ანაერობულ პირობებში 37°C - ზე 48 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ მოვახდინე გამოყოფილი ბაქტერიული კოლონიების გადატანა MRS (Man-Rogosa-Sharpe) აგარზე, რომელიც გამდიდრებული იყო ფრუქტოზით 2% და L ცისტეინით 0.1% (Vásquez *et al*. 2012). ამ მანიპულაციით მიმდევრობით მრავალჯერადი გადათესვით მოვახდინე ბაქტერიული კულტურების გასუფთავება. გრამის წესით შეღებვისა და მიკროსკოპირების შემდგომ, გამოყოფილი გასუფთავებული გრამ-დადებითი ბაქტერიული კულტივარები ინახებოდა - 80°C ტემპერატურაზე MRS ბულიონში, სადაც კრიოპროტექციითვის დამატებული იყო 25% გლიცერინი.

4.2 სოკოვანი მიკროორგანიზმების გამოყოფა ჭეოდან

ჭეოს ნიმუშები აღებულ იქნა ერთი სკის რამდენიმე ჩარჩოდან. ნიმუშების სტერილურ ფოსფატურ ბუფერში სუსპენზირების 1:10 (w/v) შემდგომ, მოხდა მათი გათესვა საფუვრის ექსტრაქტისა და მალტოზის აგარზე (YM Agar). ყვავილის მტვრის ნიმუშების სუსპენზირება ამავე ფოსფატურ ბუფერში. ინკუბაცია 30°C –ზე 48სთ ის განმავლობაში

მიმდინარეობდა. მორფოლოგიურად განსხვავებული კოლონიების გასუფთავება მოხდა მათი მრავალჯერადი გადათესვით იმავე აგარზე.

4.3 გამოყოფილი ბაქტერიების იდენტიფიკაცია

ბაქტერიული დნმ-ის ექსტრაქცია მოხდა 24 საათიანი ბულიონური კულტურებიდან ქელექსის მეთოდით (Rossetti and Giraffa 2005).

ბაქტერიული გენომიდან სპეციფიკური დაქტილოსკოპიური ანაბეჭდის მისაღებად, პოლიმორფული დნმ-ის შემთხვევითი ამპლიფიკაციის მეთოდი,,RAPD- PCR'' იქნა გამოყენებული. კერძოდ, რეაქციის წარსამართავად გამოვიყენე გენომური დნმ და პრაიმერი M13 შემდეგი მინისატელიტური სპეციფიკური ნუკლეოტიდური თანამიმდევრობით 5V-GAGGGTGGCGGTTCT-3V (Huey and Hall 1989). ამპლიფიკაცია განხორციელდა აპრობირებული პროტოკოლის დაცვით (Giraffa and Neviani 2000).

ამპლიფიკაციით მიღებული პჯრ პროდუქტების ვიზუალიზაცია მოხდა 1% აგაროზას გელის ელექტროფორეზით (1.5 V სმ$^{-1}$). პოზიტიური კონტროლის და დნმ-ის მოლეკულური მასის მარკერის სახით გელის ღრმულებში მოთავსებული იყო სტანდარტული კიბე (1-kbp plus DNA Ladder (Invitrogensrl, Milan, Italy).

ელექტროფორეზის დასრულებისას, გელი შეიღება სპეციალური საღებავით GelRed™ (Biotium) მწარმოებლის ინსტრუქციის დაცვით. მიღებული პჯრ პროდუქტის ჩრდილები გამოვლინდა ლაბორატორიული დანიშნულების კოდაკის ფირმის ფოტოკამერის მეშვეობით (Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System 290 (EDAS 290, Celbio, Milan, Italy)

მოხდა სურათების „TIFF'' ფორმატის სახით ექსპორტი ბიომათემატიკურ პროგრამაში (pattern analysis software package BioNumerics™ (version 6.0; Applied Maths BVBA, Sint-Martens-Latem, Belgium) მონაცემების შესაბამისი რედაქტირებისა და გაანალიზებისთვის. ანალიზის პრინციპი თითოეული ბაქტერიული შტამიდან მიღებული პჯრ პროდუქტის დაქტილოსკოპიური მონაცემის მსგავსი და განსხვავებული უბნების შედარებას ეფუძნებოდა. დენდროგრამის კონსტრუირებისთვის პროგრამაში გამოყენებულ იქნა არითმეტიკული საშუალოს კალკულაციის სისტემა (average UPGMA clustering algorithm).

აღნიშნული მეთოდით სულ დამუშავდა 86 ბატქერიული შტამიდან მიღებული გენომური დნმ-ის ნიმუში. შედეგის სიზუსტისა და მეთოდით მიღებული შედეგის განმეორებადობის დასადგენად მოხდა 15 ნიმუშის განმეორებითი დამუშავება.

16S რიბოსომული რნმ-ის გენის ჰიპერვარიაბელური (ჰიპერცვალებადი) უბნის ამპლიფიკაცია და სექვენირება

16S რიბოსომული რნმ-ის გენის ჰიპერვარიაბელური ფრაგმენტის (first 500 bp) ამპლიფიკაციისთვის გამოყენებულ იქნა უნივერსალური პრაიმერები: გენის 5V ბოლოდან ფორვარდ პრაიმერი შემდეგი თანმიმდევრობით GCYTAACACATGCAAGTCGA (46 Escherichia coli numbering) და რევერსული პრაიმერი GTATTACCGCGGCTGCTGG (536 E. coli numbering) (Carminati et al. 2014).

მიღებული პროდუქტების ხარისხი შემოწმდა 1% აგაროზის გელის ელექტროფორეზის გამოყენებით. პროდუქტის შესაბამისი გასუფთავების შემდგომ მოხდა ნუკლეოტიდური თანამიმდევრობის დადგენა - სექვენირება. მიღებული მონაცემების ანალიზი კი - ბიომათემატიკური პროგრამის (BioNumerics™, version 6.0; Applied Maths BVBA, Sint-Martens-Latem, Belgium) საშუალებით მოხდა.

მიღებული მონაცემები შედარებულ იქნა გენური ბანკის - ,,NCBI GenBank" - მონაცეთმთა არსებულ ბაზას. აღნიშნული მეთოდებით მიღებულ დენდროგრამაში გამოვლინდა 30 განსხვავებული,,RAPD'' კლასტერი. თითოეული ამ კლასტერის წარმომადგენელი ბაქტერიული შტამი გამოყენებულ იქნა შემდგომ ექსპერიმენტებში.

4.4 გამოყოფილი სოკოების იდენტიფიცაცია

გენომური დნმ-ის გამოყოფა მოხდა YM აგარზე 72სთ ინკუბაციით მიღებული მიცლიუმებიდან Qiagen DNeasy Plant Mini Kit-ის (Qiagen, Ltd. Crawley, UK) გამოყენებით. შტამების იდენტიფიკაცია სამიზნე გენების მონაკვეთთა პჯრ–ის მეშვეობით მიღებული პროდუქტების სექვენირებით წარიმართა. სამიზნედ საიდენტიფიკაციო გენების შერჩევა კი - კულტივარების მიკროსკოპირების საშუალებით, წინასწარი მორფოლოგიური იდენტიფიკაციაზე დაყრდნობით განხორციელდა. გამოყენებული პრაიმერებისა და სამიზნე გენების მონაცემები მოყვანილია ცხრილში 1. ამპლიფიკაციის შედეგად მიღებული პროდუქტების სექვენირება მოხდა (BigDye Terminator Sequencing kit (Applied Biosystems, CA) და ABI sequencer (Applied Biosystems) ტექნოლოგიების გამოყენებით. მიღებული მონაცემები შედარებულ იქნა GenBank-ის მონაცემებს.

ცხრილი 1. სოკოს შტამების იდენტიფიკაციისას გამოყენებული პრაიმერებისა და სამიზნე გენების ჩამონათვალი

შტამი	სამიზნე გენი	პრაიმერები
BB01,	LSU 26S რიბოსომული დნმ გენის D1-D2 პოლიმორფული უბანი (Casaregola et al. 2013)	NL-1/F63 NL-4/L R
BB02,		
BB03,		
BB04		
Po1	β-tubulin გენის პოლიმორფული უბანი (Glass and Donaldson 1995)	Bt 1a Bt 1b
Po4		
Po11A	აქტინის გენის განმასხვავებელი უბანი (Carbone and Kohn 1999)	ACT-783R ACT-512F
Po11B		
Po3A		
Po3C		
Po2A	5.8S რიბოსომული რნმ მონაკვეთი (White et al. 1990)	ITS4 ITS5
Po2C		
Po3A		
Po3C		
Po5		
Po6		
Po7		
Po8		
Po9		
Po11A		
Po11B		
Po10	16S რიბოსომული რნმ გენის (Álvarez-Pérez and Herrera 2013)	27F 1492R

4.5 პრობიოტიკური თვისებების განმაპირობებელი ბიოქიმიური თვისებების შესწავლა

4.5.1 ბაქტერიული კულტივარების ადჰეზიური თვისებების განსაზღვრა ინ ვიტრო მოდელების გამოყენებით

<u>საფუვრების უჯრედების აგლუტინაცია</u> (Zago et al. 2011)

საფუვრისა და ბაქტერიული უჯრედები ცდისთვის შემდეგნაირად მომზადდა:*Saccharomyces cerevisiae* YPD ბულიონში 30°C ტემპერატურაზე, 18 საათის განმავლობაში, აერობულად, სუსტი ნჯღრევის პირობებში ზრდის შემდეგ მოვახდინეთკულტურის ცენტრიფუგირება და სუპერნატანტის

მოცილება. შემდეგ იგი გაიხსნა იგივე მოცულობის 0.1 M ფოსფატურ ბუფერში (PBS, pH 7.2).

ბაქტერიული 18 სთ-იანი ბულიონური კულტურის იმავე ბუფერში ოთხჯერადად განზავებული 50 µl სუსპენზია გადატანილ იქნა მრავალფოსოიან მიკროჯამებში (Iwaki brand, SciTech Div. Asahi Techno Glass, Japan).

ყოველ ფოსოში ჩაემატა 50 µl ფოსფატური ბუფერი, მეორე ჯგუფში კი ბუფერი, რომელშიც გახსნილი იყო მეთილ -a-D-მანოპირანოზიდი (Sigma Aldrich) კონცენტრაციით 100 mM. მიღებულ ნარევებს დაემატა 100 მკლ 1% (v/w) *Saccharomyces cerevisiaes*-ს სუსპენზია. საფუვრის უჯრედების შემცველი იგივე სუსპენზია მოთავსდა ასევე ბაქტერიულ უჯრედებთან შერევის გარეშე, როგორც აგლუტინაციის შეფასებისას საჭირო ნეგატიური კონტროლი. მრავალფოსოიანი მიკროჯამები, მათში განთავსებული სუსპენზიების ნარევებით, მოთავსდა სანჯღრეველაზე 30 წუთის განმავლობაში 28°C ტემპერატურაზე.

საფუვრების უჯრედების ინდუცირებული ხილული აგლუტინაცია შეფასდა სინათლის მიკროსკოპის მეშვეობით 400-ჯერადი გადიდებით. მანოზას როლის გამოვლენის მიზნით ადჰეზიის მექანიზმში. აგლუტინაციის ხარისხი შედარებულ იქნა ორ ჯგუფს შორის, რომელთანაგ ერთს მეთილ-a-D-მანოპირანოზიდი ქონდა დამატებული, დამეორე კი დამატების გარეშე იყო დარჩენილი.შედეგების სიზუსტისა და განმეორებადობის დასადგენად ჩატარდა სამი ერთმანეთისგან დამოუკიდებელი იდენტური ექსპერიმენტი.

<u>აგლუტინაცია კონკანავალინ A-სთან</u> (Kim, Ogawa, and Adachi 2006)

MRS ბულიონში 18 საათიანი ინკუბაციის გზით მიღებული ბაქტერიული კულტურიდან სამჯერადი ცენტრიფუგირების (2,000 X g ,10 წთ 20°C) და 0.01M ფოსფატურ ბუფერში (phosphate-buffered saline (PBS) (P4417 Sigma)) რეცხვის შედეგად მიღებული ბაქტერიული მასა გაიხნსა იმავე ბუფერში ისე, რომ ბაქტერიების რაოდენობა სუსპენზიაში დაახლოებით $6x10^{10}$ უჯრედი/მლ-ის ტოლი ყოფილიყო.

კონკანავალინ A-ს (Sigma Chemical) სამუშაო ხსნარი გაიხსნა ფოსფატურ ბუფერში საბოლოო კონცენტრაციით 0.1563 მგ/მლ. 25 მკლ განზავებული ბაქტერიული სუსპენზია განაწილდა მრავალფოსოიან მიკროჯამებში (Iwaki brand, Sci Tech Div. Asahi Techno Glass, Japan) და მრავალჯერადი პიპეტირების მეშვეობით შეერია კონკანავალინ A- ს სამუშაო ხსნარი; ნეგატიური კონტროლისთვის კი კონკანავალინ A- ს ნაცვლად გამოყენებული იყო ფოსფატური ბუფერის იგივე მოცულობა.

ჯამების ინკუბაცია წარიმართა ოთახის ტემპერატურაზე 1 საათის განმავლობაში. ბატქერიული უჯრედების აგლუტინაცია და მისი ხარისხი

შეფასდა სინათლის მიკროსკოპის საშუალებით 400-ჯერადი გადიდებით. აგლუტინაციის ხარისხი აღინიშნა შემდეგნაირად: (-) აგლუტინაციის არ არსებობა, (+) სუსტი აგლუტინაცია, (++) ძლიერი აგლუტინაცია.

აგლუტინაციის შესაძლო დათრგუნვისთვის გამოყენებულ იქნა სამი ტიპის ნახშირწყალი: D-გლუკოზა, D-მანოზა და D-გალაქტოზა (Sigma Chemical)). ნეგატიური კონტროლის სახით გამოვიყენეთ სტერილური გამოხდილი წყალი.

1% w/v ნახშირწყლების ხსნარი მომზადდა ზემოთ აღწერილ ფოსფატურ ბუფერში, და თითოეული მათგანი ცალცალკე შეერია კონკანავალინ A- ს ხსნარს, რომლის კონცენტრაციაც შერევამდე იყო 0.3120 მგ/მლ. მომზადებული ნარევი ხსნარები დაყოვნდა ოთახის ტემპერატურაზე 10 წუთის განმავლობაში. შემდგომ მოხდა მათი შერევა იგივე მოცულობის ბაქტერიულ სუსპენზიასთან და ინკუბაცია გაგრძელდა ოთახის ტემპერატურაზე ერთი საათის განმავლობაში. აგლუტინაციის რეაქცია შეფასდა ისე, როგორც ეს აღწერილია ზემოთ ამავე პარაგრაფში.

<u>ბაქტერიული უჯრედების ზედაპირის ჰიდროფობიურობის დადგენა</u>

ბაქტერიული უჯრედების ზედაპირის ჰიდროფობიურობის დადგენა მოხდა ნახშირწყალბადებთან ბაქტერიული ადჰეზიის მეთოდით (Microbial adhesion to hydrocarbons -MATH) (Vinderola and Reinheimer 2003). ნახშირწყალბადის სახით გამოყენებულ იქნა ჰექსადეკანი. ბაქტერიული შტამების ინკუბაცია მიმდინარეობდა დანამატების შემცველ MRS ბულიონში 16-18 საათის განმავლობაში 37°C ტემპერატურაზე. ინკუბაციის შემდგომ მიღებული ბაქტერიული უჯრედები შეგროვდა ცენტრიფუგირებით (9500 ბრ x 5 წთ, 5°C), გაირეცხა 60mM კალიუმის ფოსფატის ბუფერში pH 6.5

და მასშივე გაიხსნა ისე, რომ სპექტროფოტომეტრით 560 ნმ ტალღის სიგრძეზე გაზომილი საწყისი ოპტიკური სიმკვრივე (0) 0.90 - 1.10 ოპტიკურ ერთეულებს შორის მერყეობდა.

აღწერილი სახით მომზადებული 3 მლ ბაქტერიული სუსპენზია (თითოეული შტამისთვის სამი ნიმუში) განაწილდა მომრგვალებული ძირის მქონე ჰერმეტული ხუფის მქონე სინჯარებში და დაემატა 600 მკლ ჰექსადეკანი. თითოეული სინჯარა მასში მოთავსებული ნარევით დამუშავდა მძლავრი ვორტექსირებით 2 წუთის განმავლობაში და დაყოვნდა 1 საათის განმავლობაში 37°C-ზე, რათა მომხდარიყო ფრაქციების სეპარაცია. ქვემოთ მოქცეული ფრაქცია ფრთხილად იქნა ამოტუმბული პასტერის პიპეტის მეშვეობით ისე, რომ არ გარეოდა ზემოთ მოქცეულ მსუბუქ ნახშირწყალბადის ფენას და მოხდა ამოღებული ფრაქციის ოპტიკური სიმკვრივის (A1) გაზომვა სპექტროფოტომეტრით 560ნმ ტალღის სიგრძეზე. ბაქტერიული უჯრედების ზედაპირის ჰიდროფობიურობის მაჩვენებელი

(H%) გამოვსახეთ პროცენტებში და დავადგინეთ შემდეგი ფორმულის დახმარებით H % = (1 - A1/A0) × 100.

4.5.2 ანტიბაქტერიული თვისებების განსაზღვრა (სკრინინგი ბაქტერიოცინოგენურობაზე)

ფუტკრების კოლონიებიდან გამოყოფილი 86 ბაქტერიული შტამი, შესწავლილ იქნა ანტიმიკრობული აქტივობის პოტენციალის გამოსავლენად აგარის ღრმულებში დიფუზიის მეთოდით (Well Diffusion Method) (Schillinger and Lücke 1989).

ესპერიმენტში გამოყენებული შტამები და მათი კულტივირების პირობები: ა) ცდისთვის გამოყენებული ენდოგენური ბაქტერიული შტამების ინკუბაცია ხდებოდა დანამატების შემცველ MRS ბულიონში 16-18 საათის განმავლობაში 37°C ტემპერატურაზე.

ბ) ბაქტერიოცინების წარმომქმნელი რძემჟავა ბაქტერიები *Enterococcus durans* A5-11 (Belguesmia *et al*. 2013), *Enterococcus faecalis* (Hwanhlem, Chobert, and H-Kittikun 2014), *Lactococcuslactis subsp. lactis* KT2W2L (Hwanhlem, Chobert, and H-Kittikun 2014) ინკუბაცია ხდებოდა M17 საკვებ ბულიონში 18 საათის განმავლობაში 37°C- ზე. ბულიონური კულტურიდან მიღებული უჯრედებისგან თავისუფალი სუპერნატანტი პოზიტიური კონტროლის სახით იყო გამოყენებული.

გ) ინდიკატორი (ბაქტერიოცინების მიმართ სენსიტიური) შტამი *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 გამოყენებულ იქნა MRS ნიადაგის აგარზე გასაზრდელად, რომელშიც წინასწარ გაკეთებული იყო ღრმულები. ამისათვის სტაციონარულ ფაზაში მყოფი ბულიონური კულტურები 20 მკლ-ის მოცულობით ერეოდა 20 მლ ნახევრადმყარ MRS აგარს (0.8% w/v), რომელშიც გაცივებისა და გამყარების შემდგომ კეთდებოდა 7მმ დიამეტრის ღრმულები.

დ) მეთაფლე ფუტკრის ამერიკული სიდამპლის გამომწვევი *Paenibacillus larvaes* შტამების (ATCC 9545 და 07/13) ინკუბაცია მიმდინარეობდა 37°C- ზე 48 საათის განმავლობაში გულ-ტვინის გამონაწვლილიან ბულიონში (BHI), რომელსაც დამატებული ჰქონდა თიამინის ჰიდროქლორიდი 1მგ/ლ (pH 6.6). 400 მკლ *P. larvae* ბულიონური 48 საათიანი კულტურა ემატებოდა 20 მლ BHI აგარს (0.8% w/v), და იგივე ტექნიკით ხდებოდა მასში ღრმულების გაკეთება.

ა) და ბ) პუნქტებში აღწერილი შტამებისგან მიღებული 18 სთ-იანი ბულიონური კულტურებიდან ბაქტერიული უჯრედებისგან თავისუფალი სუპერნატანტის მისაღებად ხდებოდა მათი ცენტრიფუგირება (8,000 rpm, 10 წთ, 4°C). მიღებული სტერილური ფრაქცია იყოფოდა ორ ნაწილად: ერთი ნაწილი გამოიყენებოდა ცვლილებებით, მეორე - ცვლილებების გარეშე; ხოლო

მეორე ნაწილის pH რეგულირდებოდა 6.5 ნიშნულის ფარგლებში NaOH 5 M ხსნარის დამატებით. ნეგატიური კონტროლისთვის გამოყენებული იყო MRS და M17 სტერილური ბულიონები. ორივე ჯგუფის სუპერნატანტი 50 მკლ-ის რაოდენობით თავსდებოდა ინდიკატორი ბაქტერიებით და *P. Larvaes* შტამების შემცველი აგარების ღრმულებში. ინკუბაცია მიმდინარეობდა 37°C ტემპერატურაზე 24 საათის განმავლობაში. ღრმულების ირგვლივ გაჩენილი სუფთა ზონების არსებობა რძემჟავა ბაქტერიების მიერ ინდიკატორული შტამების დათრგუნვაზე მიუთითებდა.

აღწერილი ტექნიკის გამოყენებით ასევე დავადგინეთ ბაქტერიოცინების პროდუცენტი შტამების მიერ მოქმედება ენდოგენურ ბაქტერიებზე.

4.5.3. ჭეოს ფერმენტაციის სიმულირება და რძემჟავა ბაქტერიების ფუნგიციდური პოტენციალის შესწავლა

ჭეოს ფერმენტაციის სიმულირებისთვის კომერციული პროდუქტის - პოლიფლორული მშრალი ყვავილის მტვრის მასა სიმულირებული ნექტრის ხსნარით (1:1 წ:წ) წინასწარ წინასწარ დავატენიანეთ.

სიმულირებული ნექტრის ხსნარი შედგებოდა გამოხდილ წყალში სუსპენზირებული ნახშირწყლების (20% ხსნარის საერთო მასიდან): გლუკოზის, ფრუქტოზისა და საქაროზის თანაბარი რაოდენობისგან.

ნარევის ჰომოგენიზაციის შემდგომ იგი ოთხჯერადი პასტერიზაციის მეშვეობით გავასტერილეთ, რაც გულისხმობდა 70°C –

ზე გაცხელებულ წყლის აბაზანაში 15 წუთიან ინკუბაციასა და ოთახის ტემპერატურაზე დაყოვნებას1 სთ-ის განმავლობაში, ამ ციკლის ოთხჯერადი განმეორებით.

ექსპერიმენტის ჩატარებამდე მოხდა სიმულირებული ჭეოს სუბსტრატზე 25 ბაქტერიული შტამის ზრდის უნარის დადგენა, რომლებიც 12 სხვადასხვა ბაქტერიული სახეობით იყვნენ წარმოდგენილი. ამისათვის, უჯრედული კულტურების მრავალფოსოიან ჯამებში (24-well cell culture flat-bottom plates (Corning Costar, Corning, NY) მოვახდინეთ 2მლ სტერილური სუბსტრატის განთავსება და მასში აღნიშნული შტამების შეტა34°C– ზე 48სთ-იანი ინკუბაციის შემდგომ მოვახდინეთ თითოეული ფინჯნიდან ნიმუშების აღება და ბაქტერიების გამრავლების უნარის შეფასება, რისთვისაც ნიმუშის სერიული გაზავებების აგარიან ჯამებზე გათესვა გამოვიყენეთ. ასევე განხორციელდა სუბსტრატის ზედაპირის pH- ის განსაზღვრა.

საბოლოოდ, შეირჩა 10 ბაქტერიული შტამი, რომელიც აღნიშნულ სუბსტრატში კარგი ზრდის უნარით ხასიათდებოდა: *L. kunkeei* 13p, *L. kunkeei* 1, *F. fructosus* 49a, *F. fructosus* 32, *F. pseudoficulneus* 54, *F. pseudoficulneus* 57, *F. tropaeoli* 21p, *F. tropaeoli* 46, *L. casei* 45, *E. faecalis* 43, *E. faecalis* 41, *E. durans* 42s.

მსგავსი მიდგომით მოხდა ჭეოს სინჯებიდან გამოყოფილი სოკოვანი შტამების (*Aspergillusniger, Zygosaccharomyces rouxii* და *Candida* sp.) გამორჩევაც. მხოლოდ ამ შემთხვევაში, მრავალფოსოიან ჯამებში მოთავსებული ინოკულუმების ინკუბაცია 34°C–ზე ტემპერატურაზე 10 დღის განმავლობაში გაგრძელდა. ზრდის ინტენსივობა მოწმდებოდა ზედაპირული ნაზარდის შემოწმებით და სუბსტრატიდან აღებული ნიმუშების YM აგარზე გათესვის და ინკუბაციის მეშვეობით.

ექსპერიმენტის შემდგომი ეტაპის დაგეგმვისას შერჩეული სოკოს შტამების ზრდის განსხვავებული თავისებურებები გავითვალისწინეთ, კერძოდ: *Aspergillusniger*(Po1) და *Zygosaccharomyces rouxii* (BB02) სუბსტრატის ზედაპირზე ახდენდნენ ზრდას, რაც შეუიარაღებელი თვალითაც კარგად შეიმჩნეოდა. თუმცა, ეს სუბსტრატში კოლონიის წარმომქმნელი ერთეულების განსაზღვრის მეთოდით ზრდის დინამიკაზე დაკვირვების საშუალებას არ იძლეოდა. ამიტომ, ამ ორი შტამის შემთხვევაში, ექსპერიმენტი შემდეგი თანამიმდევრობით წარვმართეთ:

2მლ სტერილური SBS ბულიონი უჯრედული კულტურების მრავალფოსოიან ჯამებში განვათავსე. ამის შემდეგ, შერჩეული რძემჟავა ბაქტერიების შტამების ღამენათევი ბულიონური კულტურების წინასწარი ცენტრიფუგირებისა (10000 ბრ/წთ. 8 წთ, 4°C) და ბაქტერიული ნალექის 1 mM ფოსფატურ ბუფერში (SPB) pH 7.0 რესუსპენდირების შემდეგ, მოვახდინე ბაქტერიული სუსპენზიის SBS–ის შემცველ მრავალფოსოიან ჯამებში შეტანა ისე, რომ ბაქტერიების კონცენტრაცია ინკუბაციის დაწყების მომენტისათვის 10^3კწე/მლ ყოფილიყო. სუბსტრატის ინკუბაცია 34°C-ზე 48 საათი გრძელდებოდა.

Aspergillus niger (Po1) – ის სპორების სუსპენზიის მისაღებად სპორების მოგროვება მოხდა YM აგარზე შტამის ერთკვირიანი ნაზარდიდან და განხორციელდა მათი რესუსპენდირება 0.1% Tween 20– ის წყალხსნარში მათი სუსპენზირება (საბოლოო კონცენტრაციით - 10^4 სპორა/მლ). სპორებიანი სუსპენზიის 5 მკლ დავაწვეთე თითოეული ფოსოს ზედაპირს, რომელიც წინასწარ ინკუბირებულ SBS-ისა და რძემჟავა ბაქტერიების ნარევს შეიცავდა. ჯამების ინკუბაცია იგივე პირობებში გაგრძელდა; *Aspergillus niger* (Po1) – ის ზრდაზე დაკვირვება ერთი კვირის განმავლობაში მიმდინარეობდა.იგივე მიდგომა გამოვიყენეთ *Z. Rouxii* (BB02) შემთხვევაშიც მხოლოდ იმ გასხვავებით, რომ საფუვრის უჯრედების მიღება (PDB) ბულიონური კულტურიდან მოხდა.

Candida sp. (BB01)– ის შემთხვევაში სუბსტრატში ბაქტერიების წინასწარი ინკუბაციის ნაცვლად საფუვრისა და ბაქტერიის ერთდროული ინოკულაცია და ინკუბაცია მოვახდინეთ. ბაქტერიული შტამების და საფუვრის უჯრედების სუსპენზიების მომზადება ზემოთ აღწერილი ტექნიკის გამოყენებით მოხდა იმ განსხვავებით, რომ ინკუბაციის დასაწყისში ორივე მათგანის კონცენტრაცია SBS –ში 10^3 კწე/მლ იყო.

ინკუბაცია 34°C -ზე 9 დღის განმავლობაში გრძელდებოდა, რომლის დროსაც სუბსტრატიდან ყოველ 24 საათში ხდებოდა 10 მკლ ნიმუშის აღება და ხორციელდებოდა მისი ფოსფატურ ბუფერში (1 mM SPB pH 7.0) სუსპენზირებული დეციმოლური განზავებების გათესვა MRS და YM აგარზე, რასაც ბაქტერიებისთვის და საფუვრებისთვის შესაბამის პირობებში ინკუბაცია მოსდევდა (ბაქტერიებისთვის ანაერობულ გარემოში 37°C-ზე, ხოლო საფუვრებისთვის აერობულად 34°C- ზე). აგარიანი ჯამების ინკუბაცია 48 საათის განმავლობაში მიმდინარეობდა.

ბაქტერიების ანტიფუნგური აქტივობის განსაზღვრის დროს, ცდის შედეგების დამაჯერებლობისთვის მრავალფოსოიანი ჯამიდან თითოეული ბაქტერიული შტამისთვის 3 ფოსო იქნა გამოყოფილი. პოზიტიურ კონტროლად სტერილური სუბსტრატი იყო მიჩნეული, ხოლო ნეგატიურ კონტროლად სოკოს უჯრედების ინოკულუმის შემცველი სუბსტრატი იყო გამოყენებული.

იგივე ბაქტერიული და სოკოს შტამების, ანტიფუნგური ეფექტის შესასწავლად ასევე ორშრიანი აგარის მეთოდიც (Rouse *et al*. 2008) იყო გამოყენებული. ყოველი ცდა ორჯერ გამეორდა.

4.5.4 პროტეოლიზური აქტივობის განსაზღვრა ულტრაგაცხელებით სტერილურ უცხიმო რძეში

შემოწმდა 86 ენდოგენური ბაქტერიული შტამის (გამოყოფილი ფუტკრის ჩიჩახვიდან, ჭეოს ნიმუშებიდან) პროტეოლიზური აქტივობა.

მეთოდში, რომლითაც ვიხელმძღვანელეთ (El-Ghaish *et al*. 2010),

მცირე ცვლილებები შევიტანეთ, რაც სტანდარტული ცხიმმოხდილი რძის ნაცვლად დიეტური რძის გამოყენებას გულისხმობდა, რომელშიც ლაქტოზის რაოდენობა 0.5%-მდე იყო შემცირებული. ამავე დროს, ჩვენს მიერ დამატებული იყო გლუკოზის, ფრუქტოზისა და საქაროზის თანაბარი რაოდენობის ნარევი ისე, რომ დამატებული ნახშირწყლების მასიური წილი რძეში 4% ის ტოლი ყოფილიყო.

ბაქტერიებს MRS დანამატებიან ბულიონში ექსპონენციური ზრდის ფაზეს მიღწევამდე ვზრდიდით. ამ ბაქტერიულ სუსპენზიას 25მკლ მოცულობით 475 მკლ რძეში ვამატებდით და ვახდენდით მის ინკუბაციას 37 °C-ზე 48 საათის განმავლობაში. პროტეოლიზური აქტივობის მქონე შესწავლილ შტამებს პოზიტიური კონტროლის სახით ვიყენებდით, ხოლო ნეგატიური კონტროლისთვის სტერილურ ინკუბირებულ რძეს ვიყენებდით.

ინკუბაციის შემდგომ 50 მკლ რძეს ემატებოდა 450 მკლ პროტეინის გამხსნელი ბუფერი, რის შემდეგაც სინჯში ცილების დაშლის სურათის გამოსავლენად ნატრიუმდოდეცილსულფატ - პოლიაკრილამიდის გელში ელექტროფორეზს მივმართავდით.

იდენტური მეთოდით გამოვიყენეთ Na- ის კაზეინატის სუბსტრატი, რომელიც გამოხდილ წყალში სუსპენზირებულ 5 მგ/მლ Na- ის კაზეინატს, 5% გლუკოზის, ფრუქტოზისა და საქაროზის ნარევს წარმოადგენდა.

4.5.5 პროტეოლიზური აქტივობის განსაზღვრა ყვავილის მტვრის სუბსტრატში

ექსპერიმენტისთვის აუცილებელი იყო მონოფლორული ყვავილის მტვრის ჰომოგენური სუბსტრატის მიღება. ამისათვის, სიმინდის ყვავილის მტვერი პირდაპირ მცენარიდან მტვრიანების ქაღალდის ჩანთებში ჩაფერთხვით შეგროვდა. მტვრის გაშრობა ოთახის ტემპერატურაზე 24 საათის განმავლობაში ხდებოდა და ექსპერიმენტში გამოყენებამდე -20°C ზე ინახებოდა (Hendriksma *et al*. 2011).

ამ შემთხვევაში სუბსტრატი შემდეგნაირად მომზადდა:

50 მგ ყვავილის მტვერი 1 მლ SRN- ში იხსნებოდა და ზემოთ აღწერილი პასტერიზაციის მეთოდით სტერილდებოდა (იხ. ქვეთავი 4.5.3.).

აღწერილი მეთოდით მომზადებულ სუბსტრატს ემატებოდა 10მკლ MRS

დანამატებიან ბულიონში გვიანი ექსპონენციური ზრდის ფაზამდე გაზრდილი ბაქტერიული კულტურა, სუბსტრატის ინკუბაცია 1 კვირა გრძელდებოდა.

200 მკლ სუბსტრატი თანაბარი რაოდენობის პროტეინის გამხსნელ ბუფერს ერეოდა, ნარევის დამუშავება 100°C- ზე 3 წუთის განმავლობაში გრძელდებოდა. შემდგომი ცენტრიფუგირების (10000 ბრ/წთ, 8 წ4°C) საფეხურის შემდეგ კი გამჭვირვალე სუპერნატანტის ანალიზი ნატრიუმდოდეცილსულფატ - პოლიაკრილამიდის გელში ელექტროფორეზით ხდებოდა.

4.5.6. ამილოლიზური აქტივობის განსაზღვრა

ამილოლიზური აქტივობის დასადგენად ბაქტერიული შტამები მოდიფიცირებულ MRS (გლუკოზა ამ ნიადაგში ჩანაცვლებული იყო იგივე რაოდენობის ხსნადი სახამებლით) ბულიონსა და აგარზე გაითესა. 37°C-ზე 48 სთ. ბაქტერიული ზრდის არსებობა ბულიონური კულტურის შემხვევაში pH–ის ცვლილების დადგენით განისაზღვრა. აგარზე ინკუბირების შემდგომ კი ბაქტერიული ზრდა ვიზუალურად მოწმდებოდა. ნაზარდის არსებობის შემთხვევაში სახამებლის ჰიდროლიზით გამოწვეული ნაზარდის ირგვლივ წარმოქმნილი ნაკლებად შეფერილი ზონების აღმოჩენის მიზნით აგარიანი ჯამები იოდიდინის ხსნარით მუშავდებოდა.

4.6 ანტიბიოტიკების მიმართ მგრძნობელობა და მინიმალური ინჰიბიტორული კონცენტრაცის განსაზღვრა

ანტიბიოტიკების მიმართ მგრძნობელობა და მინიმალური ინჰიბიტორული კონცენტრაცია მიკროგანზავების მეთოდით (Rossetti *et al*. 2009) განისაზღვრა, რომელშიც უმნიშვნელო ცვლილებები შევიტანეთ.მითითებულ მეთოდში რეკომენდებული ბაქტერიული ნიადაგი საჭირო ხარისხის ბაქტერიულ ზრდას არ იძლეოდა, ამიტომ ფორმულაში მითითებულ კომპონენტებს შორის თანაფარდობის შეცვლა გახდა აუცილებელი, კერძოდ, შევურიეთ ISO-Sensitest საკვები არის 70% და De Man-Rogosa-Sharpe დანამატებიანი არის გაზრდილი მოცულობა (30% ნაცვლად 10%-ისა). MRS- ის ხვედრითი წილის გაზრდამ საკმარისი ბაქტერიული ნაზარდის მიღების საშუალება მოგვცა.

ცდაში გამოვიყენეთ შემდეგი ანტიბიოტიკები: (ოქსიტეტრაციკლინი და ლინკომიცინი (1024-2)[1], რიფამპიცინი და კანამიცინი (32-0.0625). აგარზე 24 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ გაზრდილ ბაქტერიული შტამების კოლონიებს ვხსნიდით აღწერილ ნარევი საკვების ნიადაგის ბულიონში საბოლოო კონცენტრაციამდე 10^4 კწე /მლ.

მიღებული ბაქტერიული სუსპენზიის 100 მკლ ვათავსებდით მრავალფოსოიანი მიკროჯამების ფოსოებში (Iwaki brand, SciTech Div. Asahi Techno Glass, Japan). ჯამების ინკუბაცია მიმდინარეობდა 37°C-ზე 48 სთ-ის განმავლობაში.

მინიმალურ ინჰიბიტორულ კონცენტრაციად აღირიცხებოდა ის განზავება, რომელიც მთლიანად თრგუნავდა მიკროორგანიზმის ზრდას. შედეგების სიზუსტისა და განმეორებადობის დასადგენად, ჩატარდა სამი ერთმანეთისგან დამოუკიდებელი იდენტური ექსპერიმენტი.

4.7. *In vivo* ცდები ფუტკრებზე

4.7.1 რძემჟავა ბაქტერიების ჩართვა ფუტკრის ლარვების დიეტაში, იმუნომოდულაციური ეფექტის შესწავლა რეალურ დროში (რაოდენობრივი) პჯრ ტექნიკის გამოყენებით.

ლარვების *In vitro* გამოზრდა აუპინელის მეთოდით (Aupinel *et al*. 2005) განხორციელდა. ახლად გამოჩეკილი ლარვები ფუტკრის კოლონიიდან უჯრედული კულტურების 48 ფოსოიან ბრტყელძირიან კასეტაზე (Sigma, France) განთავსებულ Nicoplast- ის სადედე ჯამებში გადავიყვანეთ. ლარვების

[1] გამოყენებული დოზების დიაპაზონი გამოსახულია მკგ/მლ ერთეულის სახით ფრჩხილებში.

გადანერგვამდე თითოეულ ჯამში 20 მკლ ხელოვნური საკვები ნარევი თავსდებოდა, საკვებიანი ჯამები მათში ლარვების გადაყვანამდე ინკუბატორში 35°C- ზე 30 წთ თბებოდა.

ხელოვნური საკვები 50% (V/V) ფუტკრის სადედე რძისა, 50% (V/V) ნახშირწყლებისა (D-გლუკოზა (12%, w/v), D-ფრუქტოზა (12%, w/v) (Sigma, France) და საფუვრის ექსტრაქტის (2%, w/v) (Sigma, France) წყალხსნარისაგან შედგებოდა. ლარვების ხელოვნური საკვების კომპონენტების შეფარდებითი შემადგენლობა ლარვების ასაკთან ერთად იცვლებოდა.

48 საათის შემდეგ ლარვების კვება უფრო კონცენტრირებული საკვები ნარევით მეორდებოდა, რომელიც 50% (V/V) ფუტკრის სადედე რძისა, 50% (V/V) ნახშირწყლებისა და საფუვრის ექსტრაქტის წყალხსნარისგან (15 % D-გლუკოზა, 15% D- ფრუქტოზა და 3%საფუვრის ექსტრაქტი) შედგებოდა. ლარვების ინკუბაცია 35°C – ზე 90% ფარდობითი ტენიანობის პირობებში გრძელდებოდა.

ცდაში შემდეგი ბაქტერიული შტამები იქნა გამოყენებული:
მუშა ფუტკრის ჩიჩახვიდან გამოყოფილი: *Fructobacillus fructosus* 49a (KU158312), *Fructobacillus pseudoficulneus* 57 (KU158313) და *Fructobacillus tropaeoli* 46 (KU158311); ჭეოდან გამოყოფილი *Bifidobacterium asteroids* 26p (KU158310) და*Lactobacillus kunkeei* 14p (KU158309).

ბაქტერიული მასის მიღება 18 სთ-იანი ბულიონური (MRS) (Vásquez et al. 2012) კულტურის ცენტრიფუგირებით მოხდა, ბაქტერიული სედიმენტი ლარვების ხელოვნურ საკვებში თანაბრად გაიხსნა (10^7 კწე/მლ).

ცდაში ლარვების ორი ჯგუფი იყო ჩართული, თითოეული ჯგუფისთვის, რომელიც 20 ლარვისგნ შედგებოდა, იდენტური საკვები ნარევი მზადდებოდა. განსხვავებას მხოლოდ ნარევში ჩართული ბაქტერიული შტამები ქმნიდნენ. ერთ ჯგუფს აღნიშნული ნარევით ვკვებავდით, მეორეს კი ენდოგენური ბაქტერიული შტამების შემცველი იგივე შემადგენლობის საკვებით. მეორე ჯგუფი თავის მხრივ 5 ქვეჯგუფისაგან შედგებოდა, თითოეული ქვეჯგუფის საკვებს ცალ-ცალკე თითო ბაქტერიული შტამი ემატებოდა. ლარვების ინკუბაცია 90% ფარდობითი ტენიანობის პირობებში 35°C- ზე 72სთ განმავლობაში გრძელდებოდა.

პირველი კვებიდან 72 სთ-ის შემდეგ მოხდა თხევად აზოტში ლარვების მყისიერი გაყინვა და -80°C –ზე შენახვა შემდგომ დამუშავებამდე.

ასევე, დამატებით შევქმენით ლარვების ორი ჯგუფი (თითოეულში 48 ლარვა), პირველი ჯგუფის საკვებში ერეოდა ხუთივე ბაქტერიული შტამის ნარევი ($5X10^7$ კწე/მლ) ხოლო მეორეს კვება სტერილური საკვებით ხდებოდა. ორივე ჯგუფის ლარვების მოვლა აუპინელის პროტოკოლის დაცვით (Aupinel *et al*. 2005) მათ სრულ მეტამორფოზამდე გრძელდებოდა.

<u>სამიზნედ არჩეული გენების ექსპრესიის ანალიზი</u>

ლარვების ჰომოგენიზაცია 2მლ ეპენდორფებში ინერტული ბირთვაკებისა და ქსოვილის დამშლელის (4 x 30 წმ, 30 ჰ) (TissueLyser Qiagen, France) დახმარებით ქიაზოლ რეაგენტში (Qiagen, France) მოხდა. რნმ-ის გამოყოფა სპეციალური ნაკრების - RNeasy mini Kit (Qiagen, France) მეშვეობით მწარმოებლის მიერ მითითებული ინსტრუქციის შესაბამისად გაგრძელდა. გამოყოფილი რნმ–ის კონცენტრაცია კი სპექტრომეტრ NanoDrop -ის (ND-3300, NanoDrop Technologies, USA) საშუალებით გაიზომა.

კომპლემენტარული დნმ-ის სინთეზისთვის მზა რეაგენტებისგან შემდგარი ნაკრები High Capacity RNA-to cDNA Kit (Applied Biosystems™) გამოვიყენეთ. რეაქციის წარსამართავად 200 ნგ რნმ გამოვიყენე. მიღებულ პროდუქტი ათჯერ ზავდებოდა მოლეკულური ბიოლოგიისთვის საგანგებოდ მომზადებული აპიროგენული წყლით. სამიზნე გენების ექსპრესიის შესასწავლ StepOne-Plus Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, France) დაSYBR green დ ეტექციის მეთოდი გამოვიყენეთ. შესაბამისი ციკლების ზღვრული ნმნიშვნელობებო ნორმალიზებულ იქნა ორი, მასპინძლის აუცილებელი საარსებო გენის (Houskeeping gene - დიასახლისი გენის): *Actin* და *RPS5* გეომეტრიულ ნიშნულთან.

მიღებული პროდუქტისა და წყლის ნარევი იმუნური რეაქციების მაკოდირებელი გენების ტრასკრიპციის ინტენსივობის განსაზღვრისთვის იქნა გამოყენებული. რეალურ დროში (რაოდენობრივი) პჯრ მეთოდი დი პასქუალესა და სხვ. მიხედვით (Di Pasquale *et al*. 2013) იქნა შესრულებული.

სამიზნე გენებისა და გამოყენებული პრაიმერები (Gregorc *et al*. 2012) ჩამონათვალი ცხრილშია მოცემული. შესაბამისი ციკლების ზღვრული მნიშვნელობების ნორმალიზება ორი მასპინლის საარსებოდ აუცილებელი (Houskeeping gene) გენის *Actin* და *RPS5* გეომეტრიულ საშუალოსთან მიმართებაში მოხდა

ცხრილი 2. სამიზნე გენებისა და გამოყენებული პრაიმერები

სამიზნე გენი	პრაიმერი	საიდენტიფიკაციო კოდი
Abaecin	Forvard CAGCATTCGCATACGTACCA Reverse GACCAGGAAACGTTGGAAAC	GB18323
Apidaecin	Forvard TTTTGCCTTAGCAATTCTTGTTG Reverse GTAGGTCGAGTAGGCGGATCT	GB17782
Defensin1	Forvard TGCGCTGCTAACTGTCTCAG Reverse AATGGCACTTAACCGAAACG	GB19392
Hymenoptaecin	Forvard CTCTTCTGTGCCGTTGCATA Reverse GCGTCTCCTGTCATTCCATT	GB17538
PGRPSC	Forvard TAATTCATCATTCGGCGACA Reverse TGTTTGTCCCATCCTCTTCC	GB19301
PPOact	Forvard GTTTGGTCGACGGAAGAAAA Reverse CCGTCGACTCGAAATCGTAT	GB18767
AmEater	Forvard CATTTGCCAACCTGTTTGT Reverse ATCCATTGGTGCAATTTGG	GB14645
CYP4G11	Forvard CAAAATGGTGTTCTCCTTACCG Reverse ATGGCAACCCATCACTGC	GB11973
Hexam70b	Forvard GGACAATTGGATCTGCTCGT Reverse GTGTTGCTTCCGCTTTTCAG	GB10869
RPS5	Forvard AATTATTTGGTCGCTGGAATTG Reverse TAACGTCCAGCAGAATGTGGTA	GB11132
Actin	Forvard TTGTATGCCAACACTGTCCTTT Reverse TGGCGCGATGATCTTAATTT	GB17681

4.7.2 ლარვებისა და ჭუპრის სიცოცხლისუნარიანობისა და იმაგო ფორმების გამოჩეკის კონტროლი.

ლარვებისა და ჭუპრის სიცოცხლისუნარიანობა ცდის მიმდინარეობისას, იმაგო ფორმების გამოჩეკამდე ყოველდღიურად მოწმდებოდა და ხდებოდა მონაცემების ჩაწერა. ვახდენდით ახალგამოჩეკილი ფუტკრების აწონვას.

4.7.3 *in vitro* პირობებში გაზრდილი ფუტკრების ფიზიოლოგიური აქტივობის – ოლფაქტორული მგრძნობელობის ფუნქციური ტესტი

ცდის განმავლობაში მიღებული ორივე ჯგუფის, ენდოგენური ბაქტერიებით და სტერილური სუბსტრატით ნაკვები, ფუტკრის იმაგო ფორმების ოლფაქტორული მგრძნობელობა ელექტროანტენოგრამის ჩაწერის მეთოდით შევისწავლეთ (Schneider 1957).

ელექტრონანტენოგრაფიის ტექნიკა

ახლადგამოჩეკილი ფუტკრების სხეულს თავებს ვაცილებდით, მარჯვენა ანტენას მთლიანად ვათავსებდით გამტარი გელით (World Precision Instruments, Sarasota, FL) შევსებულ პლასტმასის კაპილარში, მარცხენა ანტენის მხოლოდ პირველ სეგმენტს ვამაგრებდით კაპილარის სანათურში.

ელექტრონანტენოგრამები იწერებოდა კაპილარში მოთავსებული Ag/AgCl მავთულების მეშვეობით, რომლებიც შეერთებული იყო დიფერენციულ ამპლიფიკატორთან და ოლფაქტომეტრთან. ხდებოდა სიგნალების გაფილტვრა 300 Hz სიხშირეზე და ციფრულ ფორმატს გადაყვანა 100 Hz – ზე. მონაცემების ანალიზი ხდებოდა Clampfit (Axon Instruments, DIPSI Industrie, Chatillon, France) პროგრამის საშუალებით.

ოდორანტ-სტიმულის გენერირება U – ის ფორმის ფოროვანი ბურთულებით შევსებულ შუშის ტუბებში მოთავსებული 1მლ ნაერთით ხდებოდა. ოდორანტით გაჯერებული აირი დამატენიანებელის უწყვეტი ნაკადის (80 მლ/წამი) თანხლებით მიეწოდებოდა მარცხენა ანტენის შიშველ სეგმენტს. სტიმულებს შორის ინტერვალი 2 წუთს შეადგენდა, ექსპერიმენტი სრულდებოდა ოთახის ტემპერატურაზე (25-28 C).

გამოვიყენეთ შემდეგი ტიპის ოდორანტ- სტიმულები: Ocimene, 2-heptanone, 1-hexanol, Trans-2-hexen-1-al, Isoamyl acetate, Geraniol, ნარევი: 2-heptanone/1-hexanol/geraniol (1/1/1) (St. Quentin, France)

4.7.4 კანდიდატი პრობიოტიკური ნარევის ადმინისტრირება პარაზიტ ოსემა ცერანაე –ს სპორებით ინფიცირებულ იმაგო ფორმებში და დაავადების მიმდინარეობაზე მისი ეფექტის განსაზღვრა.

ახლადგამოჩეკილი ფუტკრების მისაღებად ნოზემატოზისაგან თავისუფალი კოლონიებიდან 5 ჭუპრიანი ჩარჩოს შეირჩა და თერმოსტატში 35°C – ზე 20 სთ-ით განთავსდა. შემდგომ მოხდა ახლადგამოჩეკილი მუშა ფუტკრების გადანაწილება 60 გალიაში (თითოეულში 30 ფუტკარი). სულ 6 ჯგუფი ჩამოვაყალიბეთ, თითოეული 10 გალიით იყო წარმოდგენილი.

ექსპერიმენტის მიზანი პარაზიტ *N. ceranae* – ს სპორებით ინფიცირებული ფუტკრებზე 5 ბაქტერიული შტამისაგან შემდგარი კანდიდატი პრობიოტიკური ნარევის ეფექტის დადგენა იყო. ექვსივე ჯგუფში ნოზემას სპორებით ინფიცირებისა და პრობიოტიკური ნარევის ადმინისტრირების განსხვავებული სქემები შეირჩა (ცხრილი 3).

ცხრილი 3. ბაქტერიული ნარევისა და ნოზემას სპორების ადმინისტრირების სქემა ფუტკრების ასაკის (დღეები) მიხედვით

ჯგუფი	მუშა ფუტკრების ასაკი (დღეებში) და მანიპულაცია						
	1	4	7	10	13	16	19
1	⬭	⬭	⬭	⬭	⬭	⬭	⬭
2	⬭	✦	⬭	⬭	⬭	⬭	⬭
3	⬭	✦	✚	✚	✚	✚	✚
4	⬭	✦ ✚	⬭	⬭	⬭	⬭	⬭
5	✚	✦	⬭	⬭	⬭	⬭	⬭
6	✚	✚	✚	✚	✚	✚	✚

აღნიშვნები:
⬭ სტერილური საკვები, ✚ საკვები ბაქტერიული ნარევით, ✦ საკვები ნოზემას სპორებით.

ბაქტერიული ნარევში შემავალი შტამები:*Fructobacillus fructosus 49a;*
Fructobacillus pseudoficulneus 57;
Fructobacillus tropaeoli 46;
Bifidobacterium asteroids 26p;
Lactobacillus kunkeei 14p.

ბაქტერიული ნარევი შემდეგნაირად მომზადდა:
თითოეული შტამი MRS დანამატებიან ბულიონში ცალ-ცალკე ჩაითესა. 37°C -ზე 20 სთ ინკუბაციის შემდეგ (*Bifidobacterium asteroids 26p* შემთხვევაში 48 სთ) ბაქტერიული უჯრედების სედიმენტის მიღება ცენტრიფუგირებით განხორციელდა. ბაქტერიული სედიმენტი საქაროზის, გლუკოზისა და ფრუქტოზის (1/1/1) 50% წყალხსნარში გაიხსნა.
ნარევით კვებამდე ფუტკრები 4 სთ შიმშილობდნენ, მხოლოდ ამის შემდგომ ეძლეოდათ საკვები ისეთი გაანგარიშებით, რომ თითოეულ ინდივიდს ბაქტერიის დაახლოებით $5X10^6$ კწე უნდა შეხვედროდა.

N. ceranae – ს სპორების სუსპენზიის მისაღებად სტანდარტული მეთოდი (Fries *et al*. 2013) გამოვიყენეთ. ამისთვის, მოვახდინეთ გალიაში მყოფი ხელოვნურად ინფიცირებული ფუტკრების შუანაწლავის მაცერაცია და გამოხდილ წყალში შემდგომი სუსპენზირება. სუსპენზიის ცენტრიფუგირების (5,000 G) შემდგომ ქსოვილოვანი ნარჩენების მოსაცილებლად სუპენატანთი ფრთხილად იღვრებოდა და სპორების ნალექს კვლავ ვხსნიდით გამოხდილ წყალში, პროცედურას სულ 3 ჯერ ვიმეორებდით, რის შედეგადაც გასუფთავებულ სპორებს ვღებულობდით, სპორების კონცენტრაციის დათვლა ჰემოციტომეტრის და მიკროსკოპიის საშუალებით ხდებოდა (Human *et al*. 2013).

ნოზემას სპორების შეტანა მოხდა გალიაში მოთავსებული ფუტკრების საკვებად განკუთვნილი საქაროზის, გლუკოზისა და ფრუქტოზის ნარევის (1/1/1) 50% წყალხსნარში ისეთი გაანგარიშებით, რომ ერთ ფუტკარზე

დაახლოებით 10000 სპორა მოსულიყო (Williams et al. 2013), ამ ულუფას ფუტკრები ერთ საათში მთალიანად ღებულობდნენ (სურ. 2).

სპორებისა და ბაქტერიების შემცველი საკვებით კვების შუალედურ მონაკვეთებში გალიაში მოთავსებული ფუტკრები საქაროზის, გლუკოზისა და ფრუქტოზის ნარევის (1/1/1) 50% სტერილური წყალხსნარით იკვებებოდნენ.

სიკვდილიანობის აღრიცხვა ხდებოდა ყოველდღე, 23 დღის ასაკში კი მოვახდინეთ ყოველი გალიიდან სამი ფუტკრის შემთხვევითი შერჩევა და მათ საჭმლის მომნელებელ ტრაქტში მიკროსკოპიის საშუალებით ნოზემას სპორების დათვლა.

~

სურათი 2. მიკრობული დანამატის ადმინისტრირება ზრდასრულ ფუტკრებში.

<u>თავი 5. მიღებული შედეგები</u>

5.1 ბაქტერიული იზოლატების იდენტიფიკაცია

ყვავილის მტვრიდან (25) და მუშა ფუტკრების ჩიჩახვიდან გამოყოფილი (61) ბაქტერიული შტამის (სულ 86) პოლიმორფული დნმ-ის შემთხვევითი ამპლიფიკაციის და შესაბამისი პროგრამული დამუშავების მეშვეობით მოცემულმა დაქტილოსკოპიურმა ტიპირებამ > 79%-იანი მსგავსებით (average UPGMA clustering algorithm) განსაზღვრული 30,,RAPD" კლასტერი გამოავლინა (სურ. 3).

16S რიბოსომული რნმ-ის გენის სექვენირებამ 15 კლასტერი თითო ბაქტერიული შტამით წარმოადგინა. ოცდაათივე,,RAPD" კლასტერიდან თითო ბაქტერიული შტამის 16შ რიბოსომული რნმ-ის გენის (500-bp ყველაზე ცვალებადი მონაკვეთი) სექვენირებამ კი - რვა უკვე კლასიფიცირებული და ერთი არასრულად კლასიფიცირებული სახეობა განსაზღვრა:

L. kunkeei 1 (KX180927), 6 (KX180928), 14 p (KU158309), 18 (KX180929), 21 (KX180943), 22 (KX197199), 23a (KX180930), 23p (KX226337), 28 (KX180931), 38 (KX226339), 48b (KX180932), 55 (KX180933), 59 (KX180934) and 63b (KX226342); *L. casei* 45 (KX180935); *F. fructosus* 32 (KX180939) and 49a (KU158312); *F. tropaeoli* 21p (KX180940) and 46 (KU158311); *F. pseudoficulneus* 57 (KU158313); *E. durans* 42s (KX180941); *E. faecalis* 31 (KX226338), 40 (KX226340), 43 (KX180942); *B. asteroides* 26p (KU158310) and five unidentified strains belonging to *Lactobacillus spp*. 60 (KX180936), 61 (KX226341), 62s (KX180937) და 63s (KX180938), 64s (KX226343).

აღნიშნული კლასტერებიდან *Lactobacillus* - ის გვარი დომინირებდა (72 შტამი). გვარი *Fructobacillus* (8 შტამი), *Enterococcus* (5 შტამი), გვარი *Bifidobacterium* მხოლოდ ერთი შტამით იყო წარმოდგენილი *(Bifidobacterium asteroides).*

Lactobacillus- ს შორის 72-დან 66 (16 განსხვავებული ,,RAPD" კლასტერი) *L. kunkeei*- ით იყო წარმოდგენილი. ლაქტობაცილებში შედიოდა ასევე *L. casei* - ის ერთი შტამი. ამავე ჯგუფში დარჩენილი 5 შტამის იდენტიფიცირება კი არასრულფასოვნად მოხერხდა. მათი 16S რიბოსომული რნმ-ის გენის სექვენირებამ ორი მათგანი განსაზღვრა როგორც *L. kunkeei*, დარჩენილი სამის ნუკლეოტიდური თანამიმდევრობა კი სარწმუნოდ დაემთხვა კორეული ჯგუფის მიერ იზოლირებული შტამი - *Lactobacillus* sp. M4 ნუკლეოტიდურ თანამიმდევრობას (GenBank accession number KF543103.1).

Fructobacillus ჯგუფის შტამები შემდეგნაირად განისაზღვრა *F. fructosus* (3 შტამი), *F. tropaeoli* (3 შტამი), და *F. pseudoficulneus* (2 შტამი). *Enterococcus* ჯგუფის შტამები : *E. faecalis* (4 შტამი) და *E. durans* (1 შტამი).

შემდგომი ფენოტიპური დახასიათებისთვის საბოლოოდ 24 შტამი შეირჩა, რომელთაგანაც თითოეული დამოუკიდებელ ,,RAPD'' კლასტერს წარმოადგენდა.

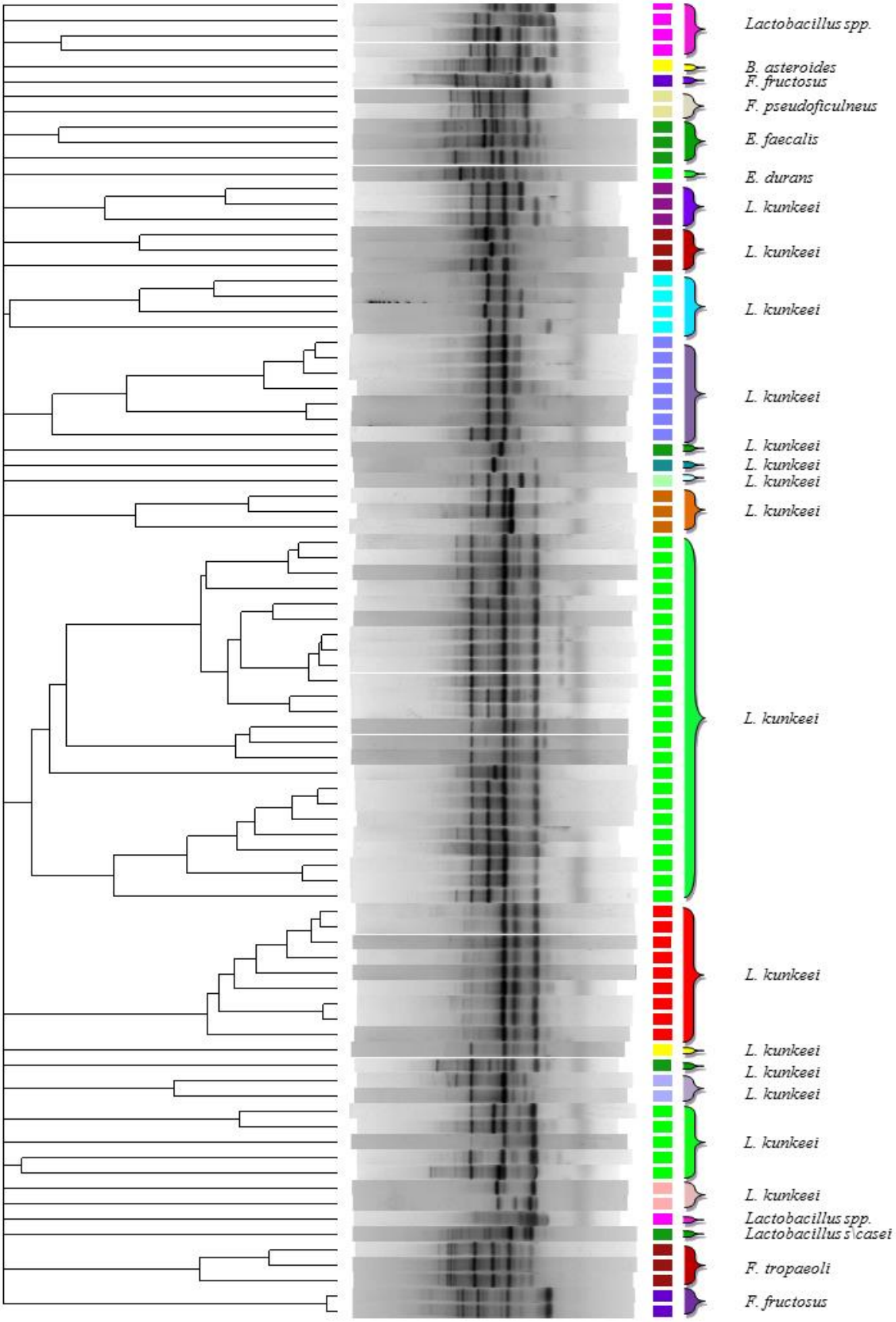
5.2 გამოყოფილი სოკოების იდენტიფიკაცია

საფუვრებით წარმოდგენილი ოთხი შტამი განისაზღვრა როგორც: *Candida sp*. (BB01), *Zygosaccharomyces rouxii* (BB02), *Rhodotorula slooffiae* (BB03) და *Lecythophora sp*. (BB04).

BB01 შტამის LSU 26S ADNr გენის ნუკლეოტიდური თანამიმდევრობა მხოლოდ 98%-ით ემთხვევა *Candida floricola* - ს ამავე გენის ნუკლეოტიდურ თანამიდევრობას, რაც მიანიშნებს, რომ ის, სავარაუდოდ, ახალი სახეობაა. იგივეს თქმაა შესაძლებელი BB04 შტამის შემთხვევაშიც, რომლის გენის ნუკლეოტიდური თანამიმდევრობაც მხოლოდ 97%-ით ემთხვევა *Lecythophoramutabilis* გენის თანამიმდევრობას (ცხრილი 3).

დანარჩენი 13 შტამი კი შემდეგნაირად განისაზღვრა: *Aspergillus niger* (Po1), *Penicillium oxalicum* (Po4), *Aureobasidium pullulans*(Po9), *Nigrospora* sp. (Po7), *Alternariainfectoria* (Po8), *Alternaria* sp. (Po2A, Po2C, Po5, Po6), *Cladosporium cladosporioides* (Po3A, Po3C, Po11A, Po11B). ერთი შტამი განისაზღვრა, როგორც ბაქტერია *Streptomyces sp.* (Po10).

სურათი 3.


Lactobacillus spp.
B. asteroides
F. fructosus
F. pseudoficulneus
E. faecalis
E. durans
L. kunkeei
L. kunkeei
L. kunkeei
L. kunkeei
L. kunkeei
L. kunkeei
L. kunkeei
L. kunkeei
L. kunkeei
L. kunkeei
L. kunkeei
L. kunkeei
L. kunkeei
L. kunkeei
L. kunkeei
L. kunkeei
L. kunkeei
Lactobacillus spp.
Lactobacillus s\casei
F. tropaeoli
F. fructosus

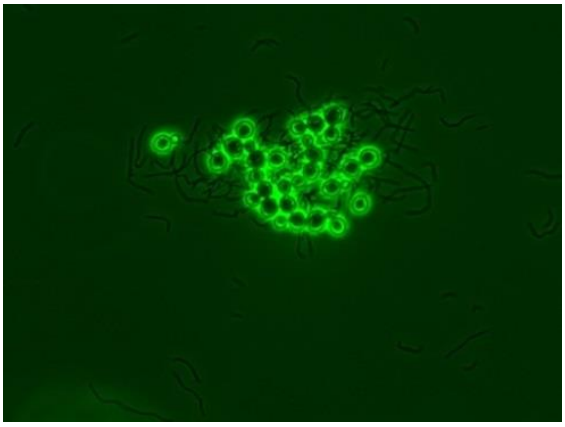
შტამის No.	ახლო ნათესავო ორგანიზმის წვდომის კოდი (accession No.)	სამიზნე გენი	იდენტურობა %	ნათესავი ორგანიზმის იდენტიფიკაცია
BB01	JF809870.1	LSU 26S ADNr	98%	*Candida floricola*
BB02	AM943657.1	LSU 26S ADNr	100%	*Zygosaccharomyces rouxii*
BB03	EU583485.1	LSU 26S ADNr	100%	*Rhodotorula slooffiae*
BB04	AB100628.1	LSU 26S ADNr	97%	*Lecythophora mutabilis*
Po1	KM189806.1	ITS	100%	*Aspergillus niger*
Po2A	KP985749.1	ITS	100%	*Alternaria alternata*
Po2C	KP985749.1	ITS	100%	*Alternaria alternata*
Po5	KP985749.1	ITS	100%	*Alternaria alternata*
Po6	KP985749.1	ITS	100%	*Alternaria alternata*
Po4	AB849501.1	βtubulin	100%	*Penicillium oxalicum*
Po7	FJ478134.1	ITS	100%	*Nigrosporasphaerica*.
Po8	KR094465.1	ITS	100%	*Alternaria infectoria*
Po9	KP131645.1	ITS	100%	*Aureobasidium pullulans*
Po3A	LN834428.1	actin	100%	*Cladosporium cladosporioides*
Po3C	HM148507	actin	100%	*Cladosporium cladosporioides*
Po11A	LN834428.1	actin	100%	*Cladosporium cladosporioides*
Po11B	LN834428.1	actin	100%	*Cladosporium cladosporioides*

ცხრილი 3. ჭეოდან გამოყოფილი სოკოების იდენტიფიკაცია სპეციფიური სამიზნე გენების ნუკლეოტიდური თანამიმდევრობის განსაზღვრით.

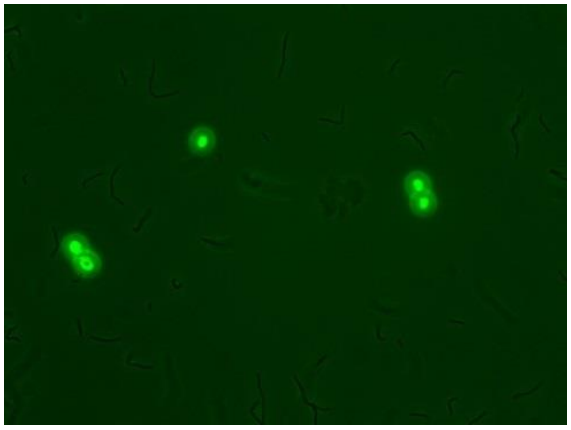
5.3 ბაქტერიების პრობიოტიკური თვისებების განმაპირობებელი ბიოქიმიური თვისებების შესწავლა

5.3.1 ბაქტერიული კულტივარების ადჰეზიური თვისებების განსაზღვრა *in vitro* მოდელების გამოყენებით

სოკო *S. cerevisiae* უჯრედების აგლუტინაციის უნარი, გამოცდილი 24 ბაქტერიული შტამიდან მხოლოდ ერთს *F. fructosus* (შტამი 49a) აღმოაჩნდა (სურ. 3). აგლუტინაციის უნარი აღნიშნულმა შტამმა ნარევში მეთილ -D- მანოპირანოზიდის დამატების შემდეგ დაკარგა (სურ. 4).



A.



B.

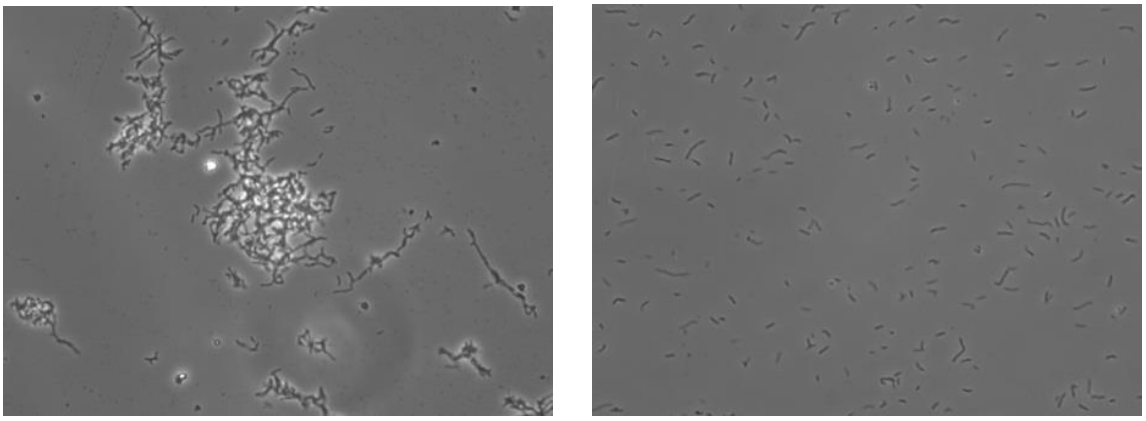
სურათი 4.

A. *F. fructosus* შტამის მიერ *S. Cerevisiae* უჯრედების აგლუტინაცია.

B. აგლუტინაციის დათრგუნვა მეთილ - D- მანოპირანოზიდით.

კონკანავალინ A – სთან აგლუტინაციის უნარი გამოცდილი 24 შტამიდან მხოლოდ ჩვიდმეტს (10 *L. kunkeei*, 2 *F. fructosus*, 3 *F. tropaeoli*, and 2 *Enterococcus*) აღმოაჩნდა. აგლუტინაციის მოვლენა ნაჩვენებია შტამ *L. kunkeei* 21p მაგალითზე (სურ. 5 A.). აგლუტინაცია ითრგუნებოდა ნახშირწყალ D - მანოზას ნარევში დამატებისას (სურ. 5 B.), მაშინ როდესაც D -გლუკოზისა და D -გალაქტოზის დამატება აგლუტინაციის ფენომენზე გავლენას არ ახდენდა (ცხრილი 5).

L. casei, Lactobacillus spp., *F. pseudoficulneus* და *B. asteroides* შტამები კონკანავალინ –თან აგლუტინაციას არ ახდენდნენ. არც ერთი გამოყენებული ბაქტერიული შტამის შემთხვევაში თვითაგლუტინაციის ფენომენს ადგილი არ ჰქონია.



A. **B.**

სურათი 5. A. *Lactobacillus kunkeei* 21p შტამი აგლუტინაცია კონკანავალინ A – სთან; B. იგივე შტამი კონკანავალინ A – ს გარემოში D- მანოზას დამატებით.

ნახშირწყალბად ჰექსადეკანის გამოყენებით ბაქტერიული შტამების ჰიდროფობიურობის კვლევის შედეგად მიღებულ მონაცემების ნიშნული (ჰიდროფობიურობა გმოხატული პროცენტებში) ბაქტერიის სახეობა სპეციფიურ დამოკიდებულებაზე მიუთითებდა:

L. kunkeei,F. tropaeoli, F. pseudoficulneus (≈90%)

Fructosus და *Lactobacillus* spp. (≈80%)

L. casei და *E. faecalis* ≈50%)

E. durans – შემთხვევაში ყველაზე დაბალი მონაცემი (6%) დაფიქსირდა.

ცხრილი 5. ბაქტერიული შტამებს აგლუტინაცია კონკანავალინ –სთან და ნახშირწყლების გავლენა აგლუტინაციაზე

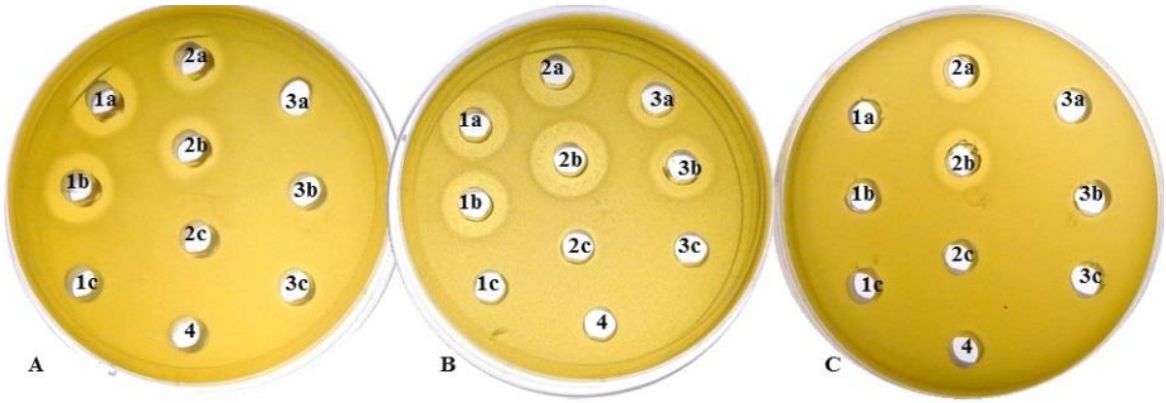
შტამი	კონკანავალინ A – სთან აგლუტინაცია			
	ნახშირწყლების გარეშე	+ D-მანოზა	+ Dგლუკოზა	+ Dგალაქტოზა
L. kunkeei 1	+	-	+	+
L. kunkeei 6	+	-	+	+
L. kunkeei 18	+	-	+	+
L. kunkeei 21	+	-	+	+
L. kunkeei 22	-	-	-	-
L. kunkeei 23a	+	-	+	+
L. kunkeei 28	+	-	+	+
L. kunkeei 48b	+	-	+	+
L. kunkeei 55	+	-	+	+
L. kunkeei 59	+	-	+	+
L. casei 45	-	-	-	-
Lactobacillus spp. 60	-	-	-	-
Lactobacillus spp. 62s	-	-	-	-
Lactobacillus spp. 63s	-	-	-	-
F. fructosus 32	+	-	+	+
F. fructosus 49a	+	-	+	+
F. tropaeoli 21p	+	-	+	+
F. tropaeoli 46	+	-	+	+
F. tropaeoli 50	+	-	+	+
F. pseudoficulneus 54	-	-	-	-
F. pseudoficulneus 57	-	-	-	-
E. durans 42s	+	-	+	+
E. faecalis 43	+	-	+	+
B. asteroides 26p	-	-	-	-

5.3.2 ანტიბაქტერიული თვისებების განსაზღვრა (სკრინინგი ბაქტერიოცინოგენურობაზე)

ფუტკრის ჩიჩახვიდან, ყვავილის მტვრიდან და ნაწლავური ტრაქტიდან გამოყოფილი ენდოგენური ბაქტერიების სრული შემადგენლობის (სულ 86 შტამი) ბაქტერიოცინების სინთეზის უნარზე სკრინინგმა უარყოფითი შედეგები აჩვენა. ისინი ვერ ახდენდნენ *P. larvae* შტამების ამ ნიშანთვისებით განპირობებულ ინჰიბიციას და, ამასთანავე, ინდიკატორი შტამის - ბაქტერიოცინების მიმართ სენსიტიური - *L. sakei subsp. sakei JCM 1157*- ის დათრგუნვას.

დათრგუნვის ერთეული შემთხვევები ბაქტერიების მიერ წარმოებულ ორგანულ მჟავებთან იყო დაკავშირებული, ბაქტერიული სუპერნატანტის ა -ის ხსნარით განეიტრალების შემდგომ ინჰიბიცია არ ხდებოდა.პოზიტიური კონტროლის სახით გამოყენებული ბაქტერიოცინების პროდუცენტი ბაქტერიული შტამები *Enterococcus durans A5-11, Enterococcus faecalis KT2W2G* *და* *Lactococcus lactis subsp. lactis KT2W2L* კი ორივე *P. larvae* და *L. sakei subsp. sakei JCM 1157* შტამების ინჰიბიციას ახდენდნენ. დათრგუნვის უნარი სამივე პროდუცენტი შტამის შემთხვევაში სუპერნატანტის ნეიტრალიზაციის შემდგომაც ნარჩუნდებოდა. ენზიმ პროტეინაზა-ზემოქმედების შემდეგ კი ინდიკატორი შტამის დათრგუნვის მოვლენას ადგილი არ ჰქონდა, რაც ფერმენტის მიერ ბაქტერიოცინის დაშლას უკავშირდებოდა.

ბაქტერიოცინების პროდუცენტი შტამების აქტიურობა 25 ენდოგენურ ბაქტერიულ შტამზეც გამოიცადა. განსაკუთრებული მდგრადობა ბაქტერიოცინების მიმართ მხოლოდ *Lactobacillus*. spp. შტამებმა აჩვენეს (სურ. 6, ცხრილი 6). დანარჩენი 11 სახეობის შემთხვევაში კი სენსიტიურობის სურათი ცვალებადობდა.



სურათი 6. ენდოგენური რძემჟავა ბაქტერიების ბაქტერიოცინების მიმართ მგრძნობელობის ილუსტრაცია.

აღნიშვნები:A) *F. pseudoficulneus* 57 B) *F. tropaeoli* 46 C) *L. kunkeei* 13p

1. *Enterococcus faecalis* KT2W2G
2. *L. lactis subsp. Lactis* KT2W2L
3. *Enterococcus durans* A5-11

შესაბამისად;1a), 2a), 3a) დაუმუშავებელი სუპერნატანტი

1b), 2b), 3b) NaOH- ით განეიტრალებულისუპერნატანტი

1c), 2c), 3c) პროტეინაზა -K დამუშავებული სუპერნატანტი.

4) სტერილური M17

ცხრილი 6. ბაქტერიოცინების პროდუცენტი შტამების მიერ ენდოგენური ბაქტერიებზე მოქმედება:

+ ზრდის დათრგუნვა

– შეუფერხებელი ზრდა

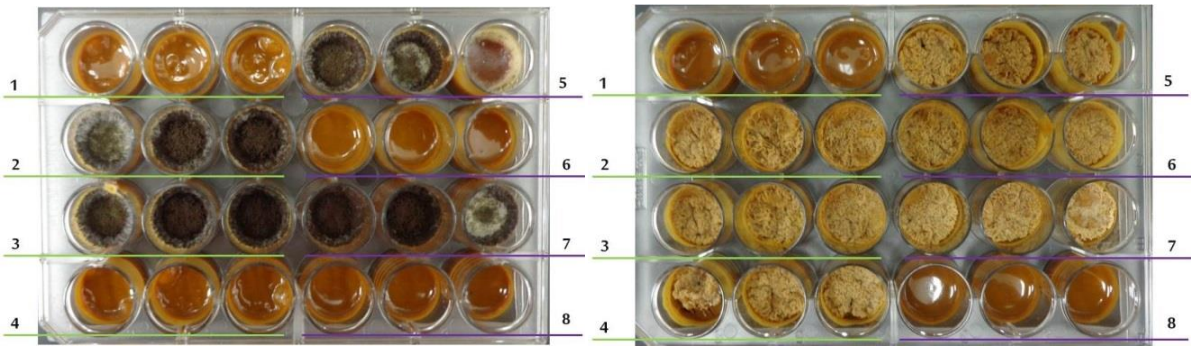
ენდოგენური ბაქტერიების შტამები	ბაქტერიოცინების პროდუცენტი შტამები		
	E. faecalis KT2W2G	*L. lactis* subsp. *lactis* KT2W2L	*E. durans* A5-11
L. kunkeei 22	+	+	+
L. kunkeei 13p	-	+	-
L. kunkeei 1	-	-	-
L. kunkeei 8p	+	+	+
L. kunkeei 58	+	+	+
L. kunkeei 26	-	-	-
L. sp 62s	-	-	-
L. sp 63s	-	-	-
L. sp 60	-	-	-
L. casei 45	+	+	-
L. sp. wkB8 8VF	+	+	-
L. kullabergensis A3	-	-	-
L. helsingborgensis A5	+	+	+
F. fructosus 49a	+	+	-
F. fructosus 32	-	+	-
F. pseudoficulneus 54	+	+	-
F. pseudoficulneus 57	+	+	-
F. tropaeoli 21p	+	+	+
F. tropaeoli 46	+	+	+
F. tropaeoli 50	+	+	+
B. asteroides 26 p	+	+	+
B. asteroides f3	+	+	+
E. faecalis 43	-	+	-
E. faecalis 41	-	+	-
E. durans 42s	-	-	-

5.3.3 ჭეოს ფერმენტაციის სიმულირება და რძემჟავა ბაქტერიების ფუნგიციდური პოტენციალის შესწავლა

ათი გამოცდილი ბაქტერიული შტამიდან ყვავილის მტვრის სუბსტრატის ზედაპირზე *A. niger*- ის ზრდის სრულ დათრგუნვას რამდენიმე მათგანი ახდენს (სურ. 7).

L. kunkeei 13p, *L. kunkeei* 1p,*F. fructosus* 49a, *F. tropaeoli* 21p, *F. tropaeoli* 46p შტამების სუბსტრატში წინასწარ შეტანისას და პრეინკუბაციის შემდგომ *A. niger*- ის ინოკულაციას მისი ზრდა არ მოჰყვებოდა. თუმცა, *F. fructosus 32, F. pseudoficulneus* 54, *F. pseudoficulneus* 57, *E. faecalis* 43, *E. faecalis* 41, *E. durans* 42s, *L. casei* 45– ის სუბსტრატში შეტანა სოკოს ზრდაზე გავლენას ვერ ახდენდა.

Z. rouxii შტამის ზრდის დათრგუნვა მხოლოდ *kunkeei* 13p და *L. kunkeei* 1p შტამების კოინკუბაციისას ხდებოდა.



a) b)

სურათი 7.

A) SBS – ში *A. niger*- ისა და ენდოგენური რძემჟავა ბაქტერიების ზრდა

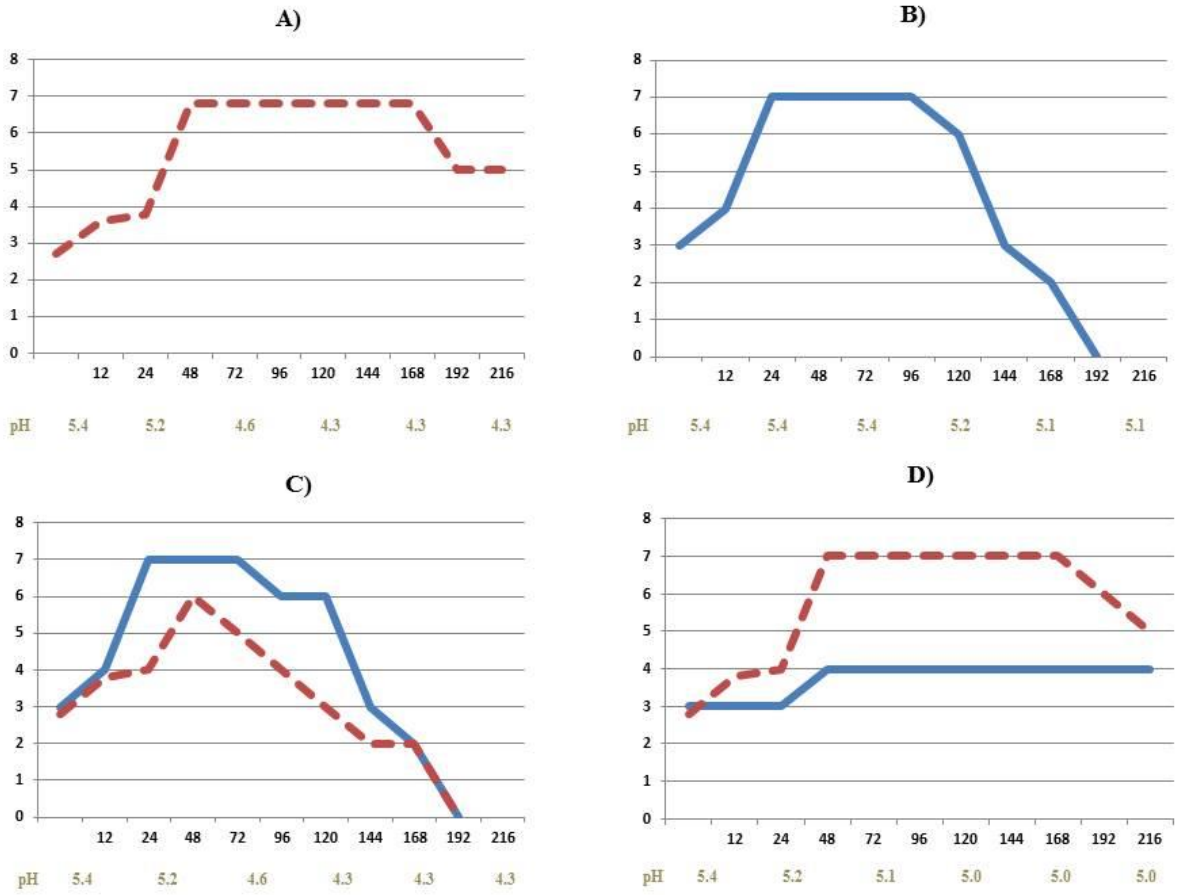
B) SBS – ში *Z. rouxii*- ისა და ენდოგენური რძემჟავა ბაქტერიების ზრდა

1-6 სოკოებისა და რძემჟავა ბაქტერიების კოინკუბაცია:

1. *L. kunkeei* 13P
2. *L. casei* 45
3. *E. durans* 42S
4. *F. fructosus*49A
5. *F. tropaeoli* 21P
6. *F. pseudoficulneus* 57
7. სუბსტრატი მხოლოდ *A) A. niger* და *B) Z. rouxii*-ის ნაზარდით
8. სტერილური სუბსტრატი

Candida sp. - ის სუბსტრატში ზრდის დინამიკაზე უფრო დეტალური დაკვირვება ამ შტამის ზრდის ხასიათით იყო განპირობებული. აღნიშნული საფუარი სუბსტრატის ყველა შრეში თანაბრად მრავლდებოდა.

ამ საფუვრის შტამის ზრდის დინამიკა სუბსტრატში რძემჟავა ბაქტერიის არსებობით იყო განპირობებული. საფუვრისა და ბაქტერიის კორეპლიკაციის ორი ტიპის სურათი გამოიკვეთა, რომელთა გამოვლენაც სუბსტრატიდან მიკროორგანიზმების ამოთესვისა და კოლონიების წარმომქმნელი ერთეულების დათვლის ტექნიკამ მოგვცა (სურ. 8).



სურათი 8.

წითელი (წყვეტილი) *Candida* sp. – ის ხოლო ლურჯი SBS- ში რძემჟავა ბაქტერიის ზრდის დინამიკას აჩვენებს.

A)*Candida* sp.

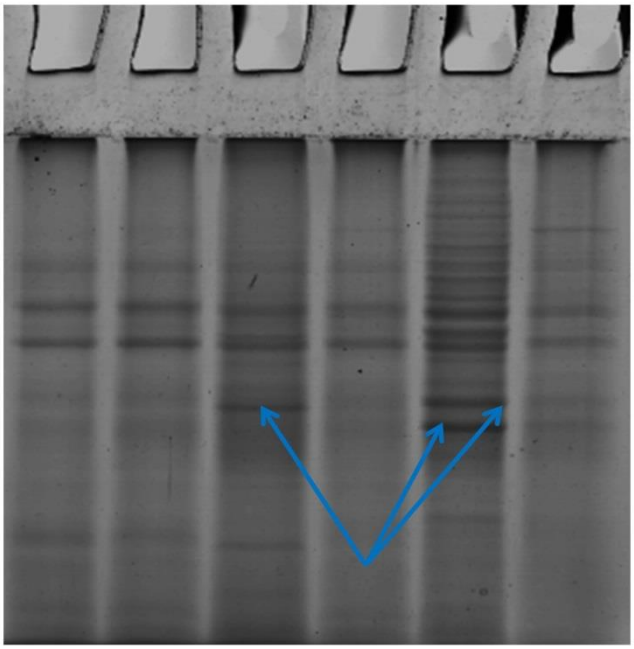
B) *L. kunkeei* 13p

C)*L. kunkeei* 13p*Candida* sp

D) *Candida* sp და *F. pseudoficulneus* 57.

რძემჟავა ბაქტერიების ანტიფუნგური ეფექტი ასევე ნათლად აისახა ყვავილის მტვრის სუბსტრატში *Candida* sp. და *Z. rouxii* შტამებთან მათი კოინკუბაციისას.

სუბსტრატში მხოლოდ საფუვრების შეტანისა და ინკუბაციისას ყვავილის მტვრის პროტეომის სურათი იცვლებოდა, რაც საფუვრების მიერ სუბსტრატისგან განსხვავებული მოლეკულური მასის მქონე პროტეინების ფრაქციის გაჩენაში ვლინდებოდა. თუმცაღა რძემჟავა ბაქტერიების ჩართვისას ეს ფენომენი ითრგუნებოდა, რაც სოდიუმდოდეცილსულფატის გელში ელექტროფორეზით ვლინდებოდა (სურ. 9).



1 2 3 4 5 6

სურათი 9. მონოფლორული ყვავილის მტვრის სუბსტრატის ელექტროფორეზი სოდიუმდოეცილსულფატის გელში.

1. სტერილური სუბსტრატი
2. *L. kunkeei* 13p
3. *Z. rouxii*
4. *Z. rouxii*და*L. kunkeei* 13p
5. *Candida sp.*
6. *Candida sp.*და *L. kunkeei* 13p

5.3.4 ბაქტერიების პროტეოლიზური და ამილოლიზური აქტივობის განსაზღვრა

გამოყენებულ ექსპერიმენტულ მოდელებში ფუტკრის ენდოგენურ რძემჟავა ბაქტერიებს პროტეოლიზური უნარი არ გამოუვლენიათ. ჭეოს სუბსტრატში გამოცდისას პროტეოლიზი არც პოზიტიური კონტროლის სახით

გამოყენებული ბაქტერიების შემთხვევაში აღნიშნულა, მაშინ, როდესაც მათ მიერ ეს უნარი რძისა და კაზეინატის სუბტსრატებზე კარგად ვლინდებოდა.მოდიფიცირებულ MRS აგარზე ბაქტერიების ძალიან სუსტი ზრდა აღინიშნა. იმავე შემადგენლობის MRS ბულიონშიც pH– ის ცვლილებაც არ დაფიქსირებულა, რაც გამოცდილი შტამების მიერ სახამებლის დაშლის უუნარობით - ამილოლიზური სისტემის სავარაუდო არარსებობით აიხსნება.

5.3.5 ანტიბიოტიკების მიმართ მგრძნობელობა და მინიმალური ინჰიბიტორული კონცენტრაცის განსაზღვრა

A. mellifera– ს ნაწლავური ბაქტერიების ანტიბიოტიკორეზისტენტობის პროფილის სტანდარტები დღესდღეობით მიღებული არ არის. ამიტომ ამ კვლევისთვის არჩევანი საქართველოს მეფუტკრეობაში ხშირად გამოყენებად და ხელმისაწვდომ ანტიბიოტიკებზე გაკეთდა (ცხრილი 7).

ჯგუფ *L. kunkeei*– ის შტამებმა ოქსიტეტრაციკლინისა და კანამიცინის მიმართ ყველაზე მაღალი რეზისტენტობა აჩვენეს. MIC დაახლოებით 256-512 და 128-256 - მგ/მლ შესაბამისად.

Fructobacillus- ის სახეობის შტამები შედარებით ნაკლები რეზისტენტობით გამოირჩეოდნენ, MIC იშნული 64 – 128 მგ/მლ მერყეობდა ოქსიტეტრაციკლინისა და კანამიცინის მიმართ. *L. casei, Lactobacillus* spp., *B. asteroides, E. durans* და *E. faecalis* შტამები მაღალი სენსიტიურობით გამოირჩეოდნენ. ამავდროულად შტამების სრული შემადგენლობა მეტად მგრძნობიარე აღმოჩნდა ლინკომიცინისა და რიფამპიცინის ძალიან მცირე დოზების მიმართაც კი.

ცხრილი 7. ოთხი ანტიბიოტიკის მინიმალური ინჰიბიტორული კონცენტრაცია (MIC მგ/მლ-ში) განსაზღვრული ცდაში გამოყენებული 24 ბაქტერიული შტამის მიმართ.

შტამი	რიფამპიცინი	ლინკომიცინი	კანამიცინი	ოქსიტეტრაციკლინი
L. kunkeei 1	0.250	0.125	256	512
L. kunkeei 6	0.0625	0.0625	16	32
L. kunkeei 18	0.250	0.125	128	512
L. kunkeei 21	0.0625	0.0625	64	256
L. kunkeei 22	0.125	0.125	128	256
L. kunkeei 22a	0.0625	0.0625	128	512
L. kunkeei 28	0.125	0.0625	128	256
L. kunkeei 48b	0.250	0.125	128	512
L. kunkeei 55	0.250	0.0625	128	512
L. kunkeei 59	0.0625	0.0625	256	512
F. tropaeoli 50	0.0625	0.0625	64	64
F. tropaeoli 21p	0.125	0.125	128	64
F. tropaeoli 46	0.125	0.125	128	64
F. pseudoficulneus 54	0.125	0.0625	64	128
F. pseudoficulneus 57	0.250	0.125	128	64
F. fructosus 49a	0.125	0.125	64	64
F. fructosus 32	0.250	0.125	128	64
L. casei 45	0.250	2	64	16
L. spp. 62s	0.250	0.250	32	32
L. spp. 63s	0.125	0.250	32	16
*L.*spp. 60	2	32	32	16
E. durans 42s	0.0625	0.5	16	8
E. faecalis 43	4	32	128	64
B. asteroids 26p	1	0.0625	64	32

5.4 *In vivo* ცდები ფუტკრებზე

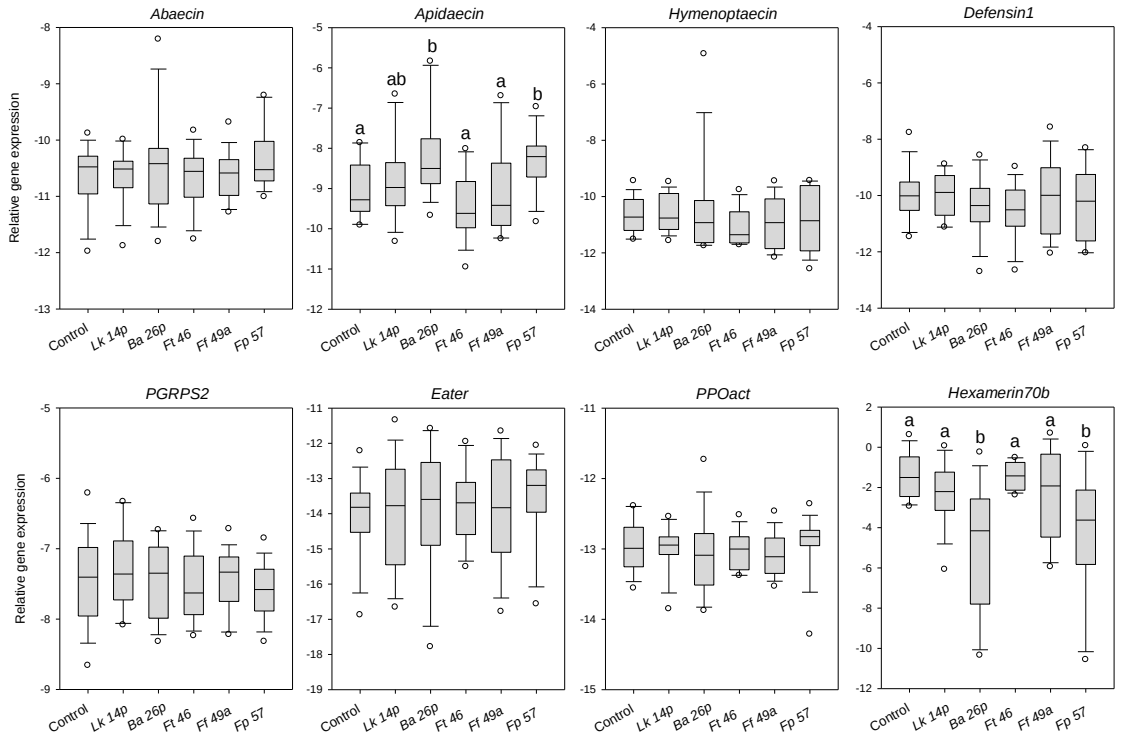
5.4.1 კანდიდატი პრობიოტიკი შტამების იმუნომოდულაციური ეფექტი

ენდოგენური ბაქტერიების ლარვებზე ზემოქმედებით იმუნური სისტემის სტიმულაციის შტამ და გენ-სპეციფიური სურათი მივიღეთ. გამოცდილი ანტიმიკრობული პეპტიდების გენებიდან მხოლოდ აპიდაეცინის ექსპრესია გაძლიერდა (კრუსკალ-ვალის ტესტი: Abaecin: , H=2.69, df=5, p=0.75; Apidaecin: H=17.07, df=5, p=0.004; Hymenoptaecin: H=5.19, df=5, p=0.39; Defensin1: H=3.56, df=5, p=0.61; Eater: H=1.82, df=5, p=0.87; PPOact: H=4.75, df=5, p=0.45 and PGRPS2: H=1.65, df=5, p=0.89; სურ 10).

აპიდაეცინის ექსპრესიის ინტენსივობას ზრდიდნენ შტამები: *Bifidobacterium asteroides* 26p და *Fructobacillus pseudoficulneus* 57 (სურ. 10). აღსანიშნავია, რომ იგივე შტამები Hexamerin 70b გენის ექსპრესიის დათრგუნვას ახდენდნენ (H=23.26, df=5, p<0.001; სურ. 10). მსგავსი ეფექტი სხვა შტამების მიერ არ გამოხატულა.

ლარვულ ფაზაში ყველა საცდელ ჯგუფში სიკვდილიანობის დაბალი მაჩვენებელი აღინიშნა (<12%), რაც ლარვების ინ ვივო გამოზრდის მიღებულ სტანდარტებს (15% სიკვდილიანობა) აკმაყოფილებს (OECD 2013). ასევე დაბალი სიკვდილიანობა იყო ენდოგენური ბაქტერიების ნარევის შემცველი საკვებით გამოზრდილ ჯგუფში, რომელმაც ლაბორატორიულ პირობებში სრული მეტამორფოზი განვლო.

ასევე არ გამოხატულა რაიმე განსხვავებული უარყოფითი ეფექტი ბაქტერიული ნარევის შემცველი საკვებით გაზრდილ ლარვებზე: მკვდარი ლარვების რაოდენობა ბაქტერიული ნარევით ნაკვებ ჯგუფში 12.5%, ხოლო სტერილურით - 10.5% იყო. უმნიშვნელო განსხვავება იყო ასევე იმაგოს ფაზამდე მისული სიცოცხლისუნარიანი ინდივიდების ჯგუფებში: ბაქტერიული მიქსით კვების შემთხვევაში 62.5%, ხოლო კონტროლისას - 68.5% გამოიჩეკა (χ^2=0.42, p=0.52).



სურათი 10. რძემჟავა ბაქტერიების გავლენა იმუნური და სამარაგო პროტეინის გენის ექსპრესიაზე ლარვებში.

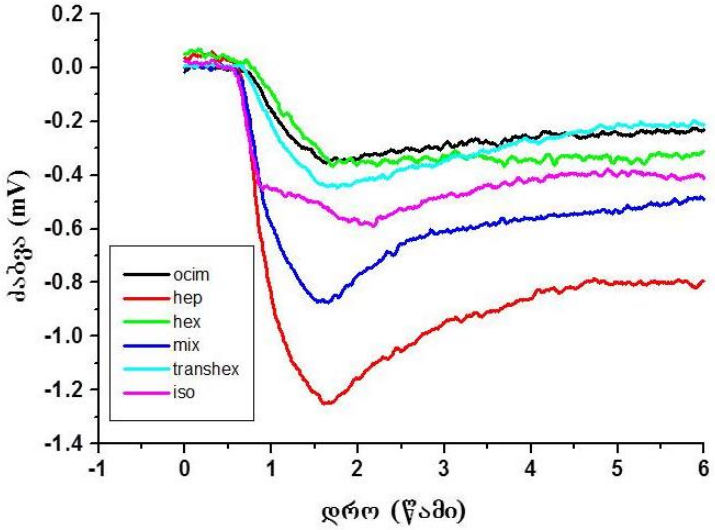
ასოები a, b, ab ჯგუფებს შორის მნიშვნელოვან განსხვავებებზე მიანიშნებს. მონაცემები დამუშავებულია (Kruskall–Wallis, Mann–Whitney ტესტებით Bonferroni -ის კორექციით). *Lk - 14p*: *Lactobacillus kunkeei* 14p, *Ba - 26p*: *Bifidobacterium asteroids* 26p, *Ft - 46*: *Fructobacillus tropaeoli* 46, *Ff - 49a*: *Fructobacillus fructosus* 49a, *Fp - 57*: *Fructobacillus pseudoficulneus* 57.

5.4.2 ლარვებისა და ჭუპრის სიცოცხლისუნარიანობისა და იმაგო ფორმების გამოჩეკის კონტროლი.

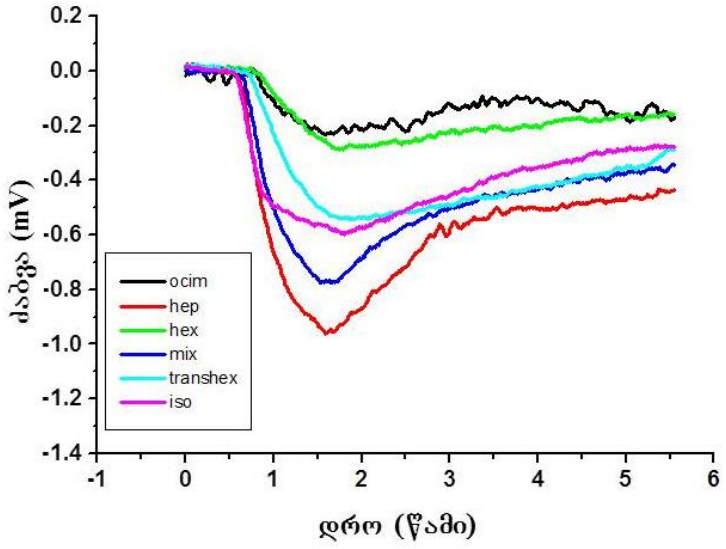
ლარვულ ფაზაში ყოველ საცდელ ჯგუფში სიკვდილიანობის მაჩვენებელი (< 12.5%) ლარვების ინ ვიტრო გამოზრდისას მისაღებ სტანდარტულ ზღვარზე (15%) (OECD 2013) ნაკლები იყო. ენდოგენური ბაქტერიებით ზემოქმედებას სრული მეტამორფოზის პროცესზე (იმაგო ფორმების გამოჩეკაზე) უარყოფითი გავლენა არ მოუხდენია. (მკვდარი ფუტკრების პროცენტი ლარვული განვითარების ფაზაში ბაქტერიული მიქსის შემთხვევაში 12.5%, კონტროლის- 10.5%, χ^2=0.1, p=0.75; გამოჩეკილი ფუტკრების - ბაქტერიული მიქსის- 62.5%, კონტროლის - 68.5% იყო, χ^2=0.42, p=0.52).

5.4.3 *In vivo* ცდისას მიღებული იმაგო ფორმების ფიზიოლოგიური აქტივობის – ოლფაქტორული მგრძნობელობის ტესტი

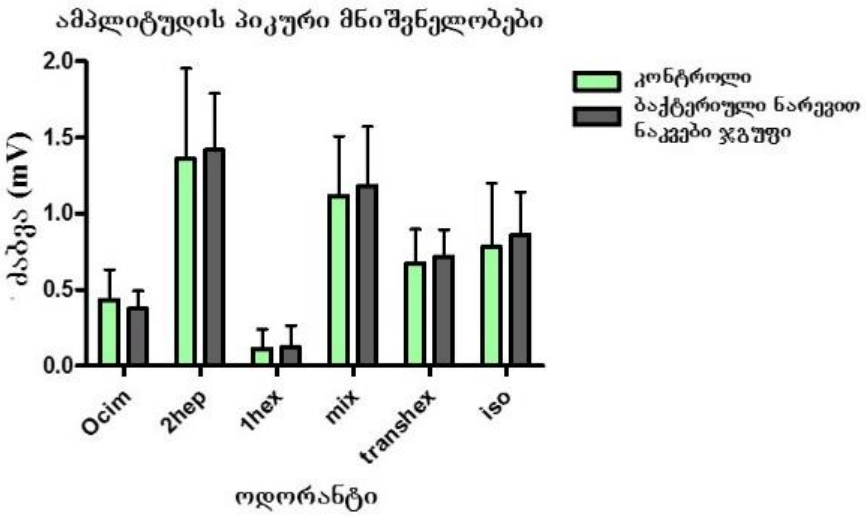
ანტენოგრაფიას სულ 18 ახლადგამოჩეკილი იმაგო ფორმა (9 ბაქტერიული ნარევით გამდიდრებული და 9 სტერილური დიეტით გაზრდილი) დაექვემდებარა. ყოველი სტიმული იძლეოდა გაზომვად ელექტროანტენოგრამულ პასუხს. სურ. 11-ზე გამოხატულია ელექტროანტენოგრამები მიღებული ფუტკრების ლაბორატორიულ პირობებში გაზრდილი იმაგო ფორმებიდან. ორივე ჯგუფიდან მიღებული ინდივიდები მსგავსი ფორმის მრუდებს იძლეოდნენ ელექტროანტენოგრამაზე. უძლიერესი პასუხი ფუტკრების ორივე ჯგუფში ელექტროანტენოგრამაზე 2-heptanone- ის შემთხვევაში, უმცირესი კი - 1-hexanol- ის შემთხვევაში მივიღეთ. ოლფაქტორული მგრძნობელობა ორივე ჯგუფში მსგავსი აღმოჩნდა, რამდენადაც ამპლიტუდის პიკურ მნიშვნელობებს შორის სტატისტიკური სხვაობა ყოველი ოდორანტის გამოყენებისას ორივე ჯგუფში მსგავსი იყო (Mann–Whitney test, $P < 0.05$).



A.



B.



. C.

სურათი 11. ლაბორატორიულ პირობებში გაზრდილი იმაგო ფორმებიდან მიღებული ელექტროანტენოგრამები: A. ბაქტერიული ნარევით გამდიდრებული დიეტით გაზრდილი ინდივიდი; B. სტერილური საკვებით გაზრდილი ინდივიდი; C. ჯგუფებს შორის ამპლიტუდის პიკური მნიშვნელობების საშუალო მონაცემების შედარება.

5.4.4 კანდიდატი პრობიოტიკური ნარევის ადმინისტრირება პარაზიტ *Nosema ceranae* – ს სპორებით ინფიცირებულ იმაგო ფორმებში და დაავადების მიმდინარეობაზე მისი ეფექტის განსაზღვრა.

გალიებში ფუტკრების იმაგო ფორმებზე ჩატარებულმა ექსპერიმენტმა ჯგუფებს შორის მნიშვნელოვანი განსხვავებები ვერ აჩვენა, კერძოდ:

1. სხვადასხვა ჯგუფებს შორის სიკვდილიანობის თვალსაზრისით სტატისტიკურად სარწმუნო სხვაობა არ აღინიშნა;

2. ექსპერიმენტის დასკვნით ფაზაზე *Nosema ceranae*–ს სპორებით ინფიცირებულ ჯგუფებში ფუტკრების ნაწლავურ ტრაქტში ნოზემას სპორების ჩატარებულმა დათვლამ სპორების კონცენტრაციებს შორის სხვადასხვა სქემის გამოყენებისას (ან გამოუყენებლობის) სარწმუნო სხვაობა არ აჩვენა.

3. მიკროორგანიზმებისგან თავისუფალი დიეტით ნაკვებ საკონტროლო ჯგუფში ნოზემას სპორები არ აღმოჩნდა.

თავი 6. შედეგების განხილვა

6.1 გამოყოფილი ბაქტერიული კულტივარების მრავალფეროვნება და ბიოქიმიური თავისებურებები

მეთაფლე ფუტკრების ჩიჩახვიდან (61) და ყვავილის მტვრიდან (25) გამოყოფილი შტამების იდენტიფიკაციამ 4 ბაქტერიული გვარი გამოავლინა. იზოლატებს შორის სჭარბობდა *Lactobacillus* გვარი, რომლის შემთხვევაშიც ყველაზე ხშირად სახეობა *L. kunkeei* გამოიყო. ბაქტერიული ბიომრავალფეროვნებისა და იზოლატების გამოყოფის სიხშირის თვალსაზრისით მსგავსი შედეგები სხვა ავტორებმაც მიიღეს (Olofsson and Vásquez 2008; Vásquez and Olofsson 2009; Neveling, Endo, and Dicks 2012).

გვარები *Fructobacillus* და *Enterococcus* შედარებით ნაკლებად, ხოლო გვარი *Bifidobacterium* მხოლოდ ერთი შტამით იყო წარმოდგენილი. *Fructobacillus* და *Bifidobacteria*- ს თანაფარდობა და გამოყოფის სიხშირე სხვა კვლევის მონცემებს (Vojvodic, Rehan, and Anderson 2013) ემთხვევა. *Fructobacillus* - ის სახეობები ხშირად გამოიყოფა ფრუქტოზით მდიდარი ნიშებიდან: ხილის ჩირი, ყვავილების სანექტრეები, ფუტკრის ეკოსისტემა (Endo, Futagawa-Endo, and Dicks 2009; Endo and Salminen 2013). *Enterococcus* შტამებიც ხშირად გამოუყვიათ ფუტკრის საჭმლის მომნელებელი ტრაქტიდან (Carina Audisio *et al.* 2011). ბიფიდობაქტერიები, როგორც წესი, ძუძუმწოვრების ნაწლავური ტრაქტის ბინადრებად ითვლებიან. საინტერესოა, რომ სახეობა *Bifidobacterium asteroides* ერთადერთი სახეობა გვარიდან, რომელიც სხვა მეცნიერებმაც ფუტკრებიდან გამოყვეს (Bottacini *et al*. 2012).

ჩვენს მიერ შესწავლილი შტამების ადჰეზიური თვისებების კვლევამ ფუტკრის ენდოგენური რძემჟავა ბაქტერიული მიკროფლორის მაღალი

ადჰეზიური პოტენციალი აჩვენა. კონკანავალინ A - სთან *L. kunkeei, F. fructosus* და *F. tropaeoli* - ის შტამებისა და Saccharomyces სოკოს უჯრედებთან შტამ - *F. fructosus49a* - ს აგლუტინაციას მანოზა-სპეციფიური ხასიათი ჰქონდა. არ არის გამორიცხული, რომ შტამი *F. fructosus49a* სოკოვანი პარაზიტის *Nosema apis* და *Nosema ceranae* უჯრედებთანაც ახდენდეს აგლუტინაციას და მათი შებოჭვის ხარჯზე მასპინძელს მიკრობული შეტევისგან იცავდეს.

აღსანიშნავია, რომ სოკოვანი ინფექციების კომპლექსურ თერაპიაში პრობიოტიკების ჩართვის წარმატებული მაგალითი უკვე არსებობს, ეს არის *Candida albicans* -ის მიერ გამოწვეული მუკოზური ზედაპირის ინფექციების მკურნალობა. (Köhler, Assefa, and Reid 2012).

ხშირად მანოზა-სპეციფიური ადჰეზიის მექანიზმებს პათოგენური ბაქტერიები მასპინძლის ეპითელური ზედაპირების კოლონიზაციისთვის იყენებენ. მეთაფლე ფუტკრებში ასეთი მექანიზმებით არჭურვილი კომენსალი თუ სიმბიონტი ბაქტერიების სიუხვე ნაწლავური ბაქტერიული ინფექციების იშვიათობის ერთ-ერთ ახსნადაც კი შეიძლება ჩავთვალოთ; მაშინ, როდესაც ლარვისა და ჭუპრის ფაზაში ფუტკრებს ბაქტერიული დაავადებები ხშირად აწუხებთ. საინტერესოა, რომ განვითარების ამ საფეხურზე მათი მიკრობიოტა საკმაოდ ღარიბია.

L. kunkeei, F. fructosus და *F. tropaeoli*-ის ჩვენ მიერ გამოცდილმა შტამებმა ჰიდროფობიურობის ყველაზე მაღალი მონაცემები აჩვენეს. ბაქტერიების უჯრედის ზედაპირის ჰიდროფობიურობა წყლიან გარემოში მათ გარკვეულ სუბსტრატებზე ფიქსაციისთვის სჭირდებათ. ფუტკრის ნაწლავური ტრაქტი, განსაკუთრებით ჩიჩახვი, დაბალკონცენტრირებული ნახშირწყლების წყალხნარის (ნექტარი) დიდი რაოდენობით და ხშირ მიღება-რეგურგიტაციას უზრუნველყოფს. სავარაუდოდ, სწორედ ჰიდროფობიურობა ეხმარებათ ამ საარსებო ნიშაში ბინადარ ბაქტერიებს ეპითელურ ზედაპირებზე ფიქსაციის დროს.

კვების მრეწველობასა და პრობიოტიკების წარმოებაში გამოსაყენებელი ბაქტერიული შტამების მიმართ უსაფრთხოების გარკვეული მოთხოვნები არსებობს. მათ შორის განსაკუთრებული ყურადღება ანტიბიოტიკების მიმართ რეზისტენტობაზეა გამახვილებული (EFSA-FEEDAP 2012).

აღნიშნულ გზამკვლევში ფუტკრებიდან გამოყოფილი ენდოგენური რძემჟავა ბაქტერიების მიმართ ანტიბიოტიკების რეზისტენტობის დასაშვები ზღვრები დადგენილი არ არის. ამდენად, ჩვენ მიერ დადგენილი მინიმალური ინჰიბიტორული კონცენტრაცია გარკვეულ საორიენტაციო წინაპირობას ქმნის ზემოთ ხსენებული პრობლემის უკეთ წარმოსაჩენად.

მეფუტკრეობაში ხშირად გამოყენებული ანტიბიოტიკების ჩვენ მიერ დადგენილი მინიმალური ინჰიბიტორული კონცენტრაცია ოქსიტეტრაციკლინისა და კანამიცინის მიმართ განსაკუთრებულად მაღალი იყო. ამის საპირისპიროდ, საცდელი ბაქტერიები რიფამპიცინისა და

ლინკომიცინის უკიდურესად დაბალი კონცენტრაციის მიმართაც კი მგრძნობელობას ავლენდნენ. ფუტკრის ნაწლავურ ტრაქტში მობინადრე ბაქტერიების ოქსიტეტრაციკლინის მიმართ მაღალი მდგრადობა დადგენილ იქნა რეზისტენტობის განმაპირობებელი გენების სკრინინგის შედეგად (Tian *et al.* 2012). ისევე როგორც ძუძუმწოვრების შემთხვევაში, ფუტკრის ენდოგენურ ბაქტერიებშიც ანტიბიოტიკორეზისტენტობის განმაპირობებელი გენების გავრცელება, სავარაუდოდ, ანტიბიოტიკების ხშირ და ხანგრძლივ გამოყენებას უკავშირდება (Tian *et al.* 2012; Murray and Aronstein 2006). კანამიცინის მიმართ კორეზისტენტობა კი, შესაძლოა, ოქსიტეტრაციკლინის ხანგრძლივ გამოყენებას და გენეტიკური პრეკურსორების კო-მობილიზაციას უკავშირდებოდეს (Tian *et al.* 2012).

საცდელი შტამების უმრავლესობა (გარდა *E. faecalis* შტამისა) რიფამპიცინისა და ლინკომიცინის მიმართ მგრძნობიარე აღმოჩნდა. ამ ანტიბიოტიკების შემცველი სამკურნალო საშუალებების მეფუტკრეობაში გამოყენების შემთხვევაში სოკოვანი ინფექციების გავრცელების რისკთან ერთად ფუტკრის მიკრობიოტას დიდ ზიანს აყენებს.

აღსანიშნავია, რომ მეფუტკრეობაში რიფამპიცინის შემცველი პრეპარატების გამოყენება შედარებით ახლო წარსულში დაიწყეს (Gurgulova 2003). შესაძლოა, ოქსიტეტრაციკლინის მსგავსად რიფამპიცინის რუტინული გამოყენების შემთხვევაში ამ ანტიბიოტიკის მიმართ ფუტკრების მიკრობიოტის წარმომადგენლებს შორის რეზისტენტობის მყარი ფენოტიპი ჩამოყალიბდეს. ეს საკითხი იმ კუთხითაც არის მნიშვნელოვანი, რომ რიფამპიცინი დღეს ტუბერკულოზის მკურნალობის სქემაშია ჩართული და მის მიმართ გამძლე ბაქტერიული შტამების ევოლუცია უკვე ისედაც მზარდ პრობლემას წარმოადგენს (Jenkins *et al.* 2005).

6.2 ენდოგენური და ეგზოგენური რძემჟავა ბაქტერიების ანტიბაქტერიული აქტივობა

ცდების შედეგებზე დაყრდნობით შეიძლება ითქვას, რომ მეთაფლე ფუტკრებიდან გამოყოფილ ენდოგენურ ბაქტერიებს ბაქტერიოცინოგენობა არ ახასიათებთ. სავარაუდოდ, ფუტკრების ნაწლავურ ტრაქტში ენდოგენური მიკროფლორის მიერ ბაქტერიოცინების პროდუქცია იშვიათი მოვლენაა, რაც იმ მოსაზრებას ეთანხმება, რომ ბაქტერიოცინების ანტიმიკრობული აქტივობის პოტენციალი განსაკუთრებით პროდუცენტი შტამის სახეობის შიგნით და მის ახლონათესავ სახეობებთან მიმართებაშია მკვეთრად გამოხატული (Cleveland *et al.* 2001). ასეთი ფენომენის ნაწლავური ტრაქტის მობინადრე ბაქტერიებშიამგვარი ფენომენის არსებობა ბაქტერიულ ბიომრავალფეროვნებას აღარიბებს.

P. larvae– ს სპორებით ინფიცირებული ლარვების დიეტაში ენდოგენური რძემჟავა ბაქტერიების პრობიოტიკური ნარევის *in vivo* სისტემაში შეტანის შედეგად ლარვების სიკვდილიანობამ საგრძნობლად იკლო (Forsgren *et al*. 2009). ამავე და მსგავსი სხვა კვლევის (Vásquez *et al*. 2012) ფარგლებში ენდოგენური რძემჟავა ბაქტერიები ევროპული სიდამპლის *Melissococcus plutonius*-ით ინფიცირებული ლარვების საკვებშიც ჩართეს, რამაც ლარვების სიცოცხლისუნარიანობაზე დადებითად იმოქმედა. აღნიშნული კვლევებით მტკიცდება ენდოგენური ბაქტერიების ეფექტი ფუტკრების ბაქტერიული დაავადებების მკურნალობის შემთხვევაში, თუმცა ლიტერატურულ წყაროებში ბაქტერიების გამოცდის მითითებული მიდგომა ჩვენს მიერ გამოყენებული მეთოდისგან განსხვავდება. კერძოდ, ბაქტერიული პათოგენებით ინფიცირებულ ლარვებზე ხვა მკვლევარები ენდოგენური ბაქტერიული ნარევით მოქმედებდნენ, თუმცა ბუნდოვანი რჩება, თუ როგორი ფორმით ხდებოდა ბაქტერიებს დიეტაში ჩართვა, როგორც თხევადი საკვები არიდან ცენტრიფუგირებით მიღებული ბაქტერიული მასისა, თუ ფერმენტირებული, ორგანული მჟავებით გამდიდრებული საკვები არის შემცველი სუსპენზიისა. ნებისმიერ შემთხვევაში აღნიშნული ცდები ბაქტერიოცინების გამომუშავებაზე დაფუძნებულ ანტიბაქტერიულ ეფექტზე არ უთითებენ.

ფუტკრის საჭმლის მომნელებელი ტრაქტიდად გამოყოფილი ენდოგენური ბაქტერიების შემთხვევში ბაქტერიოცინების მსგავსი ნაერთების წარმოქმნაზე სულ რამდენიმე კვლევა მიანიშნებს. ერთერთი კვლევის თანახმად, ასეთი თავისებურებით ფუტკრის ნაწლავიდან გამოყოფილი შტამი *E. faecalis* გამოირჩეოდა (Audisio, Terzolo, and Apella 2005). აღსანიშავია რომ *Enterococcus*- ის გვარის წარმომადგენლები, *Lactobacilli*- ის გვართან შედარებით, ფუტკრის ნაწლავურ იზოლატებს შორის იშვიათობას წარმოადგენენ. ამავე დროს ცობილია, რომ სახეობა *Enterococcus faecalis* სახეობის ბაქტერიები *M. plutonius*- ით გამოწვეული ინფექციასთან ასოცირდება (Jay D. Evans and Schwarz 2011).

ანტიბაქტერიული აქტივობა *Lactobacillus kunkeei* სახეობის მხოლოდ ერთი შტამის შემთხვევაშია აღწერილი, რომლის ბაქტერიოცინული ბუნებაც ბოლომდე დადასტურებული არ არის (Endo and Salminen 2013). ერთერთი ბოლო დროინდელი კვლევის თანახმად რძემჟავა ბაქტერიები სტრესული პირობებში გარემოშიგარკვეულ ანტიმიკრობული ბუნების პროტეინებს გამოყოფენ, რაც ავტორების აზრით ცალკე შესწავლას მოითხოვს (Butler *et al.* 2013).

ცალკე კვლევის საგანია ეგზოგენური რძემჟავა ბაქტერიების ანტიბაქტერიული მოქმედება ფუტკრის ბაქტერიული პათოგენის *P. larvae*- ს შტამების მიმართ. ასეთი ბაქტერიების აღმოჩენას არაერთი მეცნიერის შრომა დაეთმო (Yoshiyama *et al*. 2013; Jaouani *et al*. 2014). ერთერთმა სამეცნიერო გუნდმა ბაქტერიული ანტაგონიზმის პარალელურად, საცდელი რძემჟავა

ბაქტერიების იმუნომასტიმულირებელი თვისებები და ფუტკრის ანტიმიკრობული პროტეინების სინთეზის მაკოდირებელი გენების ექსპრესიას შეისწავლა (Yoshiyama *et al*. 2013).

ჩვენს მიერ *in vitro* სისტემაში საცდელი ეგზოგენური, ბაქტერიოცინების წარმომქმნელი ბაქტერიების ეფექტურობა *P. larvae* - ს შტამების მიმართ ეჭვს არ იწვევს. მეფუტკრეობის პრაქტიკაში მათი გამოყენების პერსპექტივები მიკრობული რესურს-მენეჯმენტის ფარგლებში ცალსახად იკვეთება. მიუხედავად მიღებული შედეგებისა, რჩება რამდენიმე საკითხი, რომელიც ბაქტერიოცინების პროდუცენტი ბაქტერიების ფუტკრის ბაქტერიული დაავადებების კონტროლის გამოყენების შემთხვევაში ჯერ კიდევ შესასწავლია, კერძოდ:

1. რა ფორმით უნდა მოხდეს ბაქტერიოცინების გამოყენება ფუტკრის ოჯახებში? ცნობილია, რომ ქიმიურად გასუფთავებული ბაქტერიოცინის წარმოება ძვირი ჯდება (de Arauz *et al*. 2009).

2. შეძლებს თუ არა ეგზოგენური ბაქტერიოცინ-წარმომქმნელი ბაქტერია ნაწლავის მიკორბიოტის ნაწილი გახდეს? ეგზოგენური ფუტკრის ნაწლავურ ტრაქტში ბაქტერიოცინ-პროდუცენტი შატამების დამკვიდრების პროცესი შესაძლოა გართულდეს, ვინაიდან საარსებო ნიშა ენდოგენურ მიკროფლორის მიერ უკვე დაკავებულია . გასათვალისწინებელია, რომ ენდოგენურ ბაქტერიებს მასპინძლის გარემოსთან მჭიდრო კოევოლუციური გზაა აქვთ გავლილი, ხოლო ბაქტერიოინების წარმომქმნელი ბაქტერიები, როგორც წესი, არაცოცხალი წყაროებიდან გმოიყოფა ხოლმე (Ahmadova *et al*. 2013; Hwanhlem, Chobert, and H-Kittikun 2014).

ეგზოგენური შტამი *E. durans* შესაძლოა ფუტკრის ნაწლავურ ეპითელთან ადჰეზიის უნარს სულაც მოკლებული იყოს, რითაც ჩვენს მიერ *in vitro* სისტემაში შესწავლილი ენდოგენური შტამები გამოირჩეოდნენ (ლექტინებთან აგლუტინაცია, ეუკარიოტული უჯრედების მოდელის აგლუტინაცია, მაღალი ჰიდროფობიურობა). *in vivo* სისტემაში ბაქტერიული ინფექციების სამკურნალოდ ბაქტერიოცინების პროდუცენტი მიკროორგანიზმების გამოყენების დამაჯერებელი მაგალითის პოვნა რთულია. დღეისათვის ასეთი შტამები მხოლოდ კვების ბიოტექნოლოგიაში ფერმენტატორებისა (Gurban Oglu Gulahmadov *et al*. 2006) და ბიოპრეზერვატორების სახითაა გამოყენებული, რაც შენახვის ვადის გახანგრძლივების კუთხითაა საინტერესო (Hwanhlem *et al*. 2013). გაწმენდილი სახით ბაქტერიოცინები საკვები პროდუქტებში დანამატის სახით თავიანთი სიძვირის გამო იშვიათად გამოიყენება (Settanni and Corsetti 2008).

3. რა ცვლილებებია მოსალოდნელი ფუტკრის საჭმლის მომნელებელ ტრაქტში ეგზოგენური ბაქტერიის მიკრობიომში წარამტებული დამკვიდრების შემთხვევაში? ფუტკრის საჭმლის მომნელებელ ტრაქტში წარმატებული ჩანერგვის შემხვევაში არსებობს იმის რისკი , რომ ანტიმიკრობული

პეპტიდების პროდუცენტი მიკროორგანიზმი არსებული მიკრობიოტის შემადგენლობის ცვლილებას გამოიწვევს. მსგავსი გართულება აშკარად ვლინდება ანტიბიოტიკების რუტინული გამოყენების შედეგად. ამ მოსაზრებას ჩვენ მიერ ბაქტერიოცინების პროდუცენტი შტამებისა და ფუტკრის ენდოგენურ ბაქტერიების გამოყენებით ჩატარებული ცდების შედეგები ამყარებს, სადაც ნათლად გამოჩნდა ეგზოგენური ბაქტერიის ზემოქმედება ენდოგენური მიკრობების მიმართ.

გარდა ამისა, ლიტერატურიდან ცნობილია, რომ არა თუ ბაქტერიოცინების პროდუცენტი, არამედ ამ უნარს მოკლებული პრობიოტიკი ბაქტერიის მასპინძლის დიეტაში ჩართვაც კი, ნაწლავში არსებულ მიკრობულ კომპოზიციას საგრძნობლად ცვლის (O'Toole and Cooney 2008). ამდენად, ბაქტერიოცინების *in vivo* სისტემაში გამოყენება ჰოლობიონტის კომპლექსურად აღქმას მოითხოვს (Bordenstein and Theis 2015).

4. რამდენად სტაბილური იქნება ეგზოგენური ბაქტერია ინ ვივო სისტემაში? ეს საკითხი ცალკე შესწავლის საგანია.. ფუტკრის საჭმლის მომნელებელი ტრაქტში მობინადრე მიკროორგანიზმები და მათი პროდუქტები ენზიმების მრავალფეროვან ნაკრებს ქმნიან. შესაბამისად, ფუტკრის ორგანიზმში მოხვედრილი ბაქტერიოცინების მდგრადობა კითხვის ნიშნის ქვეშ დგება (Rossano *et al*. 2012).

6.3 ჭეოს სოკოვანი მიკროფლორა და ენდოგენური რძემჟავა ბაქტერიების ანტიფუნგური აქტივობა

ის ფაქტი, რომ ჭეოს სიმულირებულ (SBS) სუბსტრატზე სოკოვანი მიკროორგანიზმების უმრავლესობის ზრდა არ აღნიშნება იმაზე მიანიშნებს, რომ, შესაძლოა, მათი უმრავლესობა ყვავილის მტვერში მხოლოდ სპორადიული კონტამინანტების სახით გვხვდებოდეს. ჩვენ მიერ გამოყოფილი სოკოების სახეობების საარსებო გარემო მეტად მრავალფეროვანია, თუმცა ზოგიერთი მათგანი ნექტრიდან *Aureobasidium pullulans* (Álvarez-Pérez and Herrera 2013) და სხვადახვა ბოტანიკური წარმოშობის ყვავილის მტვრის ნიმუშებიდანაც გამოყოფის ფაქტები სხვა ლიტერატურულ წყაროებშიც არის მოხსენებიული (González et al. 2005). საინტერესოა, რომ *Penicillium* spp., *Alternaria* spp., *Aspergillus niger* იზოლატები მათ მიერ მიკოტოქსინის სინთეზის უნარზე იყო შესწავლილი.

როგორც ჩანს, *A. niger, Z. rouxii* და *Candida* sp. ჭეოში მუდმივი მიკროფლორის ნაწილია, რამდენადაც ისინი სიმულირებულ სუბსტრატში მონოკულტურის სახით უხვად და სტაბილურად იზრდებოდნენ ისევე, როგორც რძემჟავა ბაქტერიების თანხლებით. ბუნებრივია, რომ სოკოები ჭეოს მიკრობული გარემოს მოდიფიკაციას ახდენენ. ეს დაკვირვება განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია, რამდენადაც ერთ-ერთი იზოლატი, კერძოდ, . ნიგერ,

ფუტკრის ბარტყის დაავადებას – ჩაკირულ ბარტყს იწვევს. ასევე, შესაძლოა, ის ადამიანებში რესპირატორული ინფექციის გამომწვევადაც მოგვევლინოს (Foley et al. 2014).

ჩვენ მიერ ჩატარებული ექსპერიმენტმა აჩვენა, რომ . ნიგერ ჭეოს სიმულირებულ სუბსტრატზე კარგად იზრდება. სკაში არსებულ ყვავილის მტვრის მარაგში ამ მიკროორგანიზმის ზრდამ, შესაძლოა, ფუტკრის ბარტყის დაინფიცირების რისკი გაზარდოს და თავად ჭეოს მარაგის გაფუჭება გამოიწვიოს.

ენდოგენური ბაქტერიების მიერ ცდებში ნაჩვენები ანტიფუნგური აქტივობა ფუტკრის ჭეოში მიკროორგანიზმებს შორის კონკურენტულ და ანტაგონისტურ დამოკიდებულებაზე მიანიშნებს. საგულისხმოა, რომ იგივე ბაქტერიული და სოკოს შტამები განსხვავებულ ლაბორატორიულ მოდელში ასეთივე დამოკიდებულებას არ ავლენენ, რაც მათ მიერ კონკრეტული ფენოტიპის მხოლოდ დამახასიათებელ საარსებო ნიშაში გამოვლენის უნარით შეიძლება აიხსნას.

ფუტკრის კოლონიაში სოკოების მიერ შესრულებული ზუსტი როლი უცნობია, თუმცა ჩვენს ექსპერიმენტებში ნათლად ჩანს, რომ ორი სახეობის შტამი ჭეოს სიმულირებულ გარემოში ინტენსიურად იზრდება და ყვავილის მტვრის პროტეომის სურათსაც ცვლის.

6.4 ენდოგენური რძემჟავა ბაქტერიების ენზიმური აქტივობა

ჩვენს ექსპერიმენტებში ენდოგენური რძემჟავა ბაქტერიების პროტეოლიზური და ამილოლიზური აქტივობა არ დადასტურდა, თუმცა მათი ანტიფუნგური უნარი მკვეთრად იყო გამოხატული. ქედან გამომდინარე შეიძლება დავასკვნათ, რომ ენდოგენური რძემჟავა ბაქტერიები ყვავილის მტვრის ფერმენტაციაში მონაწილეობენ და ამავდროულად იცავენ მას სოკოვანი მიკროორგანიზმებისგან; თუმცა, ასევე უნდა აღინიშნოს, რომ ისინი ცილოვანი კომპონენტებისა და პოლისაქარიდების ჰიდროლიზში მონაწილეობას არ ღებულობენ. (Anderson *et al*. 2014) ამდენად, მათი ძირითადი როლი, ძირითადად, ფუტკრის კოლონიის ცილოვანი საკვების კონსერვაციაში გამიხატება . გაცილებით სუსტად ვლინდება მათი როლი სხვა ნუტრიენტების წინასწარ „მონელებაში". ეს ჰიპოთეზა სხვა მეცნიერების მიერ გაკეთებულ დასკვნებს ეთანხმება, რომლის თანახმადაც სახამებლის არარსებობა ჭეოში, შესაძლოა, ფუტკრების მიერ წარმოებული ამილოლიზური ენზიმების აქტივობს შედეგი იყოს (Herbert, Bee, and Shimanuki 1978).

ჭეოს სიმულირებული სუბსტრატის ფერმენტაციის პირობებში დაფიქსირებული პროტეომის ცვლილებები და ენდოგენური ბაქტერიების მიერ ამ ფენომენის მხოლოდ ნაწილობრივი დათრგუნვა გვაფიქრებინებს, რომ

ყვავილის მტვრის ბიოქიმიური ჭეოდ ტრანსფორმაცია, მიკრობული რეზიდენტების (სოკოებისა და ბაქტერიების) ერთობლივი მონაწილეობით მიმდინარეობს.

როგორც ჩანს, ფუტკრის კოლონიის ენდოგენური რძემჟავა ბაქტერიები საკუთარ საარსებო ნიშას კარგად არიან შეგუებულნი. მათი ანტაგონიზმი სოკოვან მიკროორგანიზმებთან კოლონიაში მიკოზური ინფექციების კონტროლის საშუალებას იძლევა.

კვლევის შედეგები ასევე გვაფიქრებინებს, რომ ენდოგენური მიკროფლორის გამოყენება ყვავილის მტვრის ფარმაკოლოგიურ და ინდუსტრიულ წარმოებაშია შესაძლებელია. გაერთიანებული ერების სოფლის მეურნეობისა და საკვების ორგანიზაციის (Food and Agriculture Organization of the United Nations) რეკომენდაციით, ფუტკრების მიერ შეგროვებული ყვავილის მტვრის ჭეოდ გარდასაქმნელად, ეგზოგენური რძემჟავა ბაქტერიების გამოყენებაა რეკომენდებული (Krell 1996), რაც გერმანელი მეცნიერის (Dany 1988) რჩევას ემყარება. უცნობია, რამდენად ეფექტურად ასრულებენ ეგზოგენური რძემჟავა ბაქტერიები "დაკისრებულ მოვალეობას", თუმცა ჩვენ მიერ შესრულებულ ექსპერიმენტებში ამ ტიპის სხვადახვა სახეობის ბაქტერიების გამოყენებამ გვაჩვენა, რომ ისინი ჭეოს სიმულირებული სუბსტრატის აციდოფიკაციას განსხვავებულად ახდენენ. წარმოდგენილი კვლევის შედეგები კიდევ ერთხელ მიუთითებს, რამდენად მნიშვნელოვანია ფუტკრის კოლონიის მიკრობული სამყაროს შესწავლა და ენდოგენური ბაქტერიების სიმბიოზური თავისებურებების გარკვევა.

6.5 ენდოგენური რძემჟავა ბაქტერიები და იმუნური სისტემის მოდულირება

ჩვენს მიერ ჩატარებულმა კვლევამ პირველად დაადატურა, რომ ენდოგენური ბაქტერიები ფუტკრის ლარვების იმუნური სისტემის სტიმულირებას განაპირობებენ. როგორც ჩანს, ენდოგენური ფლორის ეს ფუნქციური თავისებურება შტამ–სპეციფიურია, რაც ასევე ნაჩვენები იყო (Yoshiyama *et al*. 2013) მიერ. ამ ფენომენის მექანიზმები ცნობილი არ არის, თუმცა შეიძლება ვივარაუდოთ, რომ იმუნური სისტემა მიკროორგანიზმების უჯრედის გარკვეულ კომპონენტებზე (დნმ, უჯრედის კედლის ნაწილებზე და სხვადასხვა მეტაბოლიტებზე) ისევე სპეციფიურად რეაგირებს, როგორც ეს ძუძუმწოვრებშია აღწერილი (Medzhitov 2007).

ცნობილია, რომ იმუნური სისტემის მიერ პათოგენებისა და კომენსალი ბაქტერიების გარჩევაში „სიმბიონტებთან ასოცირებული მოლეკულური კასკადების" მექანიზმებია ჩართული. ეს მექანიზმები კომენსალების მიერ ნაწლავური ტრაქტის ეპითელური ზედაპირების წარმატებულ კოლონიზაციას ემყარება, რასაც მასპინძლის იმუნური სისტემის ტოლერანტული დამოკიდებულების მოპოვებაც ახლავს თან (J. L. Round *et al*. 2011). მწერების

მიკრობიოტის მაგალითზე ეს ფენომენი ჯერ საკმარისად აღწერილი არ არის. სავარაუდოდ, მეთაფლე ფუტკრის მიკრობიოტას მსგავსი მექანიზმები უნდა გააჩნდეს, რამდენადაც მათ შედარებით მდგრადი მიკრობული ფლორა ახასიათებთ. გარდა ამისა, ცნობილია, რომ პეპტიდოგლიკანის შემცნობი პროტეინის მეშვეობით მწერების იმუნური სისტემა კომენსალი ბაქტერიების მიმართ ტოლერანტობის, ხოლო პათოგენური მიკროორგანიზმების მიმართ რეზისტენტობის განმსაზღვრავ მექანიზმებს ააქტიურებს (Royet, Gupta, and Dziarski 2011).

საინტერესოა, რომ იმუნური სტიმულაცია მხოლოდ აპიდაეცინის გენის ექსპრესიის გაძლიერებით გამოიხატა. ასეთივე ანტიმიკრობული პეპტიდების სპექტრის შერჩევითი რეაგირება სხვა ავტორების მიერ იქნა აღწერილი ფუტკრის ლარვებში ბუნებრივი პათოგენური ბაქტერიებისა და ასევე ეგზოგენური რძემჟავა ბაქტერიების ზემოქმედების დროს (Yoshiyama *et al*. 2013; Jay D Evans and Lopez 2004).

აპიდაეცინის ექსპრესიის გაძლიერების პარალელურად იგივე შტამების მიერ სამარაგო პროტეინის მაკოდირებელი გენის (Hexamerin 70b) ექსპრესიის შემცირებას ჰქონდა ადგილი. Hexamerin 70b მაკოდირებელი გენის ექსპრესიის დათრგუნვა, შესაძლოა, შემდეგნაირად აიხსნას: იმუნური პასუხის გამოსახატავად მაკროორგანიზმი დამატებით ენერგიას „აბანდებს", რის საპასუხოდაც გარკვეული მეტაბოლური აქტივობები უკანა პლანზე გადაიწევა. მაგალითად, მწერებში, მარტივი იმუნური პასუხი – ენკაფსულირებაა. მის განსახორციელებლად მეტაბოლურ აქტივობას ორგანიზმი 28%-ით ზრდის (Freitak *et al*. 2003; Ardia *et al*. 2012), შედეგად ასეთი სტრესის ქვეშ მოყოლილი ინდივიდების სიცოცხლის ხანგრძლივობა მცირდება (Armitage *et al*. 2003).

მსგავსი მოვლენა იქნა აღწერილი ფუტკრებში ბაქტერიული და მექანიკური სტრესის შესწავლისას (Lourenĉo *et al*. 2009). ჰექსამერინები ლარვების ორგანიზმში ცხიმოვან სხეულაკებში სინთეზირებული პროტეინებია. მწერის მეტამორფოზის პერიოდში აქტიურად ხდება ამ ცილების დისპერსია ჰემოლიმფაში; ასეთი გზით ამინომჟავების მიწოდება მწერს განვითარებაში ეხმარება (Burmester and Scheller 1999).

ლოურენცოს და სხვ. (2009) აზრით, სამარაგო პროტეინის ბიოსინთეზზე მიმართული რესურსების ნაწილი სწორედ იმუნური პასუხის გენერირებას (ანტიმიკრობული პეპტიდების სინთეზს) ხმარდება (Lourenĉo *et al*. 2009).

ამდენად, ენდოგენური ბაქტერიების ადმინისტრირებისას შემჩნეული მაკროორგანიზმის სპეციფიური (შტამისა და იმუნური პასუხის გათვალისწინებით) რეაგირება, შესაძლოა, ადაპტაციურ ხასიათსაც ატარებდეს, რაც ენერგიის დაზოგვასა და მასპინძლის ორგანიზმში ჰომეოსტასის შენარჩუნებისთვის კრიტიკული მნიშვნელობას ატარებს.

ნავარაუდევია, რომ ხელოვნური იმუნური გამოწვევის ფონზე მაკროორგანიზმის სიცოცხლის ხანგრძლივობა მცირდება ან, შესაძლებელია

გარკვეული ფიზიოლოგიური აქტივობას ზიანი მიადგეს (Armitage *et al*. 2003). ფუტკრებში იმუნურ პასუხზე გაწეული ძალისხმევა კოლონიის სიძლიერის გამომხატველ პარამეტრებზე შეიძლება აისახოს. კერძოდ, ის კოლონიები, რომლებიც *Paenibacillus larvae* – ს ზემოქმედების გამო აბაეცინის გენის ჰიპერექსპრესიით ხასიათდებოდნენ, ნაკლები პროდუქტიულობით გამოირჩეოდნენ (J D Evans and Pettis 2005).

ჩვენ მიერ ბაქტერიების ნარევის შემცველი საკვებით ნაკვები ლარვების სრული მეტამორფოზი როგორც საკონტროლო, ისე საცდელი ჯგუფის შემთხვევაში წარმატებით წარიმართა. ბაქტერიების ნარევის შემცველი დიეტით გამოზრდილი მუშა ფუტკრების ოლფაქტორულ მგრძნობელობაზე რაიმე ნეგატიური გავლენა ასევე არ აღნიშნულა.

6.6 ნოზემას ინფექცია და პრობიოტიკური ნარევის ეფექტი

ჩვენ მიერ ჩატარებული ცდით ნოზემას ინფექციაზე კანდიდატი პრობიოტიკური ნარევის რაიმე თერაპიული ზეგავლენა დადგენილი არ იქნა. მსგავსი ტიპის ცდაში სხვა სამეცნიერო ჯგუფის მიერ დადებითი შედეგი იქნა მიღებული (Baffoni *et al*. 2016).

თუმცა, მათ მიერ ეფექტის დასადგენად სხვა მეთოდოლოგიური მიდგომა იყო გამოყენებული, ცდაში ფუტკრებიდან გამოყოფილი ენდოგენური შტამები იყო გამოყენებული, რომლებიც ჩვენს მიერ გამოყენებული ბაქტერიებისგან განსხვავდებიან.

ასევე განსხვავებული იყო ნოზემას სპორების წყაროც. რაც შეეხება მეთოდიკას, მათ არ მოუხდენიათ ცდის დასკვნით ეტაპზე ინფიცირებული საცდელი ფუტკრების ნაწლავურ სანათურში სპორების რაოდენობის დათვლა და პათოგენის ტიტრი მხოლოდ რაოდენობრივი პჯრ მეთოდით დაადგინეს.

დასკვნები

დისერტაციაში წარმოდგენილი კვლევის შედეგები და მათი გაანალიზება შემდეგი დასკვნების გამოტანის საშუალებას იძლევა:

- ჩვენ მიერ დადგინილი ფუტკრის ენდოგენურ რძემჟავა ბაქტერიებში მანოზა-სპეციფიკური ადჰეზიის ხასიათი და მაღალი ჰიდროფობიურობის შტამ/სახეობის სპეციფიკური მაჩვენებლები, ენდოგენური ბაქტერიების მიერ ეკოლოგიური ნიშის კოლონიზაციისას მათ მიერ განსხვავებული ადჰეზიური მექანიზმების გამოყენებასა და ადაპტაციას ადასტურებს.

- წარმოდგენილი კვლევისას ფენოტიპის დონეზე პირველად გამოვლინდა ფუტკრის ენდოგენურ ბაქტერიებში ანტიბიოტიკების მიმართ რეზისტენტობა; ეს კი იგივე χგუფის სხვა ბაქტერიების გენეტიკური კვლევის მონაცემებს ადასტურებს.

- დადგინდა, რომ ჩვენ მიერ გამოყოფილ ენდოგენურ ბაქტერიებს ბაქტერიოცინების წარმოქმნის უნარი არ ახასიათებთ, ხოლო ეგზოგენური ბაქტერიოცინ-წარმომქმნელი ბაქტერიების პრაქტიკაში გამოყენებას კი ედოგენური მიკროფლორის დათრგუნვის რისკი ახლავს თან.

- ფუტკრის ცილოვანი საკვებიდან - ჭეოდან გამოყოფილი სოკოვანი იზოლატების მრავალფეროვნების და სიმულირებული ჭეოს სუბსტრატში მათი ზრდის თავისებურებები იმის მაჩვენებელია, რომ ფუტკრის კოლონიაში მიკოზური ინფექციებისთვის ენდოგენური რძემჟავა ბაქტერიული მიკროფლორა დამატებით ბარიერს ქმნის.

- პირველად გამოვლინდა ენდოგენური ბაქტერიების ნაწილის გავლენა ფუტკრის ანტიმიკრობული პეპტიდების მაკოდირებელი გენების ექსპრესიის გაძლიერებაზე პარალელურად კი - სამარაგო პროტეინის სინთეზის გენების ექსპრესიის დათრგუნვა. ამიტომ გასათვალისწინებელია იმუნური სისტემის სტიმულაციისას ხომ არ ხდება სხვა ფიზიოლოგიური აქტივობის უკანა პლანზე გადაწევა.

გამოყენებული ლიტერატურა

Adl, Sina M., Alastair G B Simpson, Mark A. Farmer, Robert A. Andersen, O. Roger Anderson, John R. Barta, Samuel S. Bowser, et al. 2005. "The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists." *Journal of Eukaryotic Microbiology*. doi:10.1111/j.1550-7408.2005.00053.x.

Ahmadova, Aynur, Svetoslav Dimitrov Todorov, Yvan Choiset, Hanitra Rabesona, Tannaz Mirhadi Zadi, Akif Kuliyev, Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco, Jean Marc Chobert, and Thomas Haertlé. 2013. "Evaluation of Antimicrobial Activity, Probiotic Properties and Safety of Wild Strain Enterococcus Faecium AQ71 Isolated from Azerbaijani Motal Cheese." *Food Control*. doi:10.1016/j.foodcont.2012.08.009.

Allen, M D, and E P Jeffree. 1956. "The Influence of Stored Pollen and of Colony Size on the Brood Rearing of Honeybees." *Ann. Appl. Biol.* 44 ((4)): 649–56. doi:10.1111/j.1744-7348.1956.tb02164.x.

Álvarez-Pérez, Sergio, and Carlos M. Herrera. 2013. "Composition, Richness and Nonrandom Assembly of Culturable Bacterial-Microfungal Communities in Floral Nectar of Mediterranean Plants." *FEMS Microbiology Ecology* 83 (3): 685–99. doi:10.1111/1574-6941.12027.

Anderson, Kirk E, Mark J Carroll, Tim Sheehan, Brendon M Mott, Patrick Maes, and Vanessa Corby-Harris. 2014. "Hive-Stored Pollen of Honey Bees: Many Lines of Evidence Are Consistent with Pollen Preservation, Not Nutrient Conversion." *Molecular Ecology* 23 (23): 5904–17. doi:10.1111/mec.12966.

Ardia, Daniel R., Jacob E. Gantz, Brent C. Schneider, and Stefanie Strebel. 2012. "Costs of Immunity in Insects: An Induced Immune Response Increases Metabolic Rate and Decreases Antimicrobial Activity." *Functional Ecology* 26 (3): 732–39. doi:10.1111/j.1365-2435.2012.01989.x.

Armitage, Sophie A O, J. J W Thompson, J. Rolff, and M. T. Siva-Jothy. 2003. "Examining Costs of Induced and Constitutive Immune Investment in Tenebrio Molitor." *Journal of Evolutionary Biology* 16 (5): 1038–44. doi:10.1046/j.1420-9101.2003.00551.x.

Aronstein, Katherine, and Beth Holloway. 2013. "Honey Bee Fungal Pathogen, Ascosphaera Apis; Current Understanding of Host-Pathogen Interactions and Host Mechanisms of Resistance." *Microbial Pathogenesis*, 402–10.

Audisio, M. Carina, Horacio R. Terzolo, and María C. Apella. 2005. "Bacteriocin from Honeybee Beebread Enterococcus Avium, Active against Listeria Monocytogenes." *Applied and Environmental Microbiology* 71 (6): 3373–75. doi:10.1128/AEM.71.6.3373-3375.2005.

Aufauvre, Julie, David G. Biron, Cyril Vidau, Régis Fontbonne, Mathieu Roudel, Marie Diogon, Bernard Viguès, Luc P. Belzunces, Frédéric Delbac, and Nicolas Blot. 2012. "Parasite-Insecticide Interactions: A Case Study of Nosema Ceranae and Fipronil Synergy on Honeybee." *Scientific Reports*. doi:10.1038/srep00326.

Aupinel, Pierrick, Dominique Fortini, Helena Dufour, J. N. Tasei, Bruno Michaud, J. F. Odoux, and M. H. Pham-DELÈGUE. 2005. "Improvement of Artificial Feeding in a Standard in Vitro Method for Rearing Apis Mellifera Larvae." *Bulletin of Insectology* 58 (2): 107–11.

Bäckhed, Fredrik, Ruth E Ley, Justin L Sonnenburg, Daniel A Peterson, and Jeffrey I

Gordon. 2005. “Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine.” *Science (New York, N.Y.)* 307 (5717): 1915–20. doi:10.1126/science.1104816.

Baffoni, L., F. Gaggìa, D. Alberoni, R. Cabbri, A. Nanetti, B. Biavati, and D. Di Gioia. 2016. “Effect of Dietary Supplementation of Bifidobacterium and Lactobacillus Strains in Apis Mellifera L. against Nosema Ceranae.” *Beneficial Microbes* 7 (1): 45–51. doi:10.3920/BM2015.0085.

Becher, Matthias A., Juliet L. Osborne, Pernille Thorbek, Peter J. Kennedy, and Volker Grimm. 2013. “Towards a Systems Approach for Understanding Honeybee Decline: A Stocktaking and Synthesis of Existing Models.” *Journal of Applied Ecology*. doi:10.1111/1365-2664.12112.

Belguesmia, Y., Y. Choiset, H. Rabesona, M. Baudy-Floc’h, G. Le Blay, T. Haertlé, and J. M. Chobert. 2013. “Antifungal Properties of Durancins Isolated from Enterococcus Durans A5-11 and of Its Synthetic Fragments.” *Letters in Applied Microbiology* 56 (4): 237–44. doi:10.1111/lam.12037.

Belhadj, H, D Harzallah, D Bouamra, F Khennouf, S Dahamna, and M Ghadbane. 2014. “Phenotypic and Genotypic Characterization of Some Lactic Acid Bacteria Isolated from Bee Pollen: A Preliminary Study.” *Bioscience of Microbiota, Food and Health* 33 (1): 11–23. doi:10.12938/bmfh.33.11.

Boekhorst, Jos, Roland J. Siezen, Marie Camille Zwahlen, David Vilanova, Raymond D. Pridmore, Annick Mercenier, Michiel Kleerebezem, Willem M. de Vos, Harald Brüssow, and Frank Desiere. 2004. “The Complete Genomes of Lactobacillus Plantarum and Lactobacillus Johnsonii Reveal Extensive Differences in Chromosome Organization and Gene Content.” *Microbiology* 150 (11): 3601–11. doi:10.1099/mic.0.27392-0.

Boncristiani, Humberto, Robyn Underwood, Ryan Schwarz, Jay D. Evans, Jeffery Pettis, and Dennis Vanengelsdorp. 2012. “Direct Effect of Acaricides on Pathogen Loads and Gene Expression Levels in Honey Bees Apis Mellifera.” *Journal of Insect Physiology* 58 (5): 613–20. doi:10.1016/j.jinsphys.2011.12.011.

Bordenstein, Seth R., and Kevin R. Theis. 2015. “Host Biology in Light of the Microbiome: Ten Principles of Holobionts and Hologenomes.” *PLOS Biology* 13 (8): e1002226. doi:10.1371/journal.pbio.1002226.

Bottacini, Francesca, Christian Milani, Francesca Turroni, Borja S??nchez, Elena Foroni, Sabrina Duranti, Fausta Serafini, et al. 2012. “Bifidobacterium Asteroides PRL2011 Genome Analysis Reveals Clues for Colonization of the Insect Gut.” *PLoS ONE* 7 (9). doi:10.1371/journal.pone.0044229.

Breeze, Tom D, Bernard E Vaissière, Riccardo Bommarco, Theodora Petanidou, Nicos Seraphides, Lajos Kozák, Jeroen Scheper, et al. 2014. “Agricultural Policies Exacerbate Honeybee Pollination Service Supply-Demand Mismatches across Europe.” *PloS One* 9 (1): e82996. doi:10.1371/journal.pone.0082996.

Bromenshenk, Jerry J., Colin B. Henderson, Charles H. Wick, Michael F. Stanford, Alan W. Zulich, Rabih E. Jabbour, Samir V. Deshpande, et al. 2010. “Iridovirus and Microsporidian Linked to Honey Bee Colony Decline.” *PLoS ONE* 5 (10). doi:10.1371/journal.pone.0013181.

Buddington, Randal. 2009. “Using Probiotics and Prebiotics to Manage the Gastrointestinal Tract Ecosystem.” In *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*, 1–31.

Burmester, T., and K. Scheller. 1999. “Ligands and Receptors: Common Theme in Insect

Storage Protein Transport." *Naturwissenschaften* 86 (10): 468–74. doi:10.1007/s001140050656.

Butler, Èile, Magnus Alsterfjord, Tobias C Olofsson, Christofer Karlsson, Johan Malmström, and Alejandra Vásquez. 2013. "Proteins of Novel Lactic Acid Bacteria from Apis Mellifera Mellifera: An Insight into the Production of Known Extra-Cellular Proteins during Microbial Stress." *BMC Microbiology* 13: 235. doi:10.1186/1471-2180-13-235.

Carbone, Ignazio, and Linda M. Kohn. 1999. "A Method for Designing Primer Sets for Speciation Studies in Filamentous Ascomycetes.pdf." *Mycologia* 91 (3): 553–56. doi:10.2307/3761358.

Carina Audisio, M., Mar??a J. Torres, Daniela C. Sabat??, Carolina Ibarguren, and Mar??a C. Apella. 2011. "Properties of Different Lactic Acid Bacteria Isolated from Apis Mellifera L. Bee-Gut." *Microbiological Research* 166 (1): 1–13. doi:10.1016/j.micres.2010.01.003.

Carminati, D., F. Tidona, M. E. Fornasari, L. Rossetti, A. Meucci, and G. Giraffa. 2014. "Biotyping of Cultivable Lactic Acid Bacteria Isolated from Donkey Milk." *Letters in Applied Microbiology* 59 (3): 299–305. doi:10.1111/lam.12275.

Carvalho, C.M., S. Meirinho, M.L.F. Estevinho, and A. Choupina. 2010. "Yeast Species Associated with Honey: Different Identification Methods." *Archivos de Zootecnia*. doi:10.4321/S0004-05922010000100011.

Casaregola, Serge, Noémie Jacques, Christelle Louis-Mondesir, Monika Coton, and Emmanuel Coton. 2013. "Citeromyces Nyonsensis Sp. Nov., a Novel Yeast Species Isolated from Black Olive Brine." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63 (PART8): 3086–90. doi:10.1099/ijs.0.049296-0.

Clark, Truman B. 1978. "A Filamentous Virus of the Honey Bee." *Journal of Invertebrate Pathology*. doi:10.1016/0022-2011(78)90197-0.

Cleveland, Jennifer, Thomas J. Montville, Ingolf F. Nes, and Michael L. Chikindas. 2001. "Bacteriocins: Safe, Natural Antimicrobials for Food Preservation." *International Journal of Food Microbiology*. doi:10.1016/S0168-1605(01)00560-8.

Collado, Maria Carmen, Jussi Meriluoto, and Seppo Salminen. 2008. "Adhesion and Aggregation Properties of Probiotic and Pathogen Strains." *European Food Research and Technology* 226 (5): 1065–73. doi:10.1007/s00217-007-0632-x.

Cox-Foster, Diana L, Sean Conlan, Edward C Holmes, Gustavo Palacios, Jay D Evans, Nancy A Moran, Phenix-Lan Quan, et al. 2007. "A Metagenomic Survey of Microbes in Honey Bee Colony Collapse Disorder." *Science (New York, N.Y.)* 318 (5848): 283–87. doi:10.1126/science.1146498.

Cremer, Sylvia, Sophie A O Armitage, and Paul Schmid-Hempel. 2007. "Social Immunity." *Current Biology*. doi:10.1016/j.cub.2007.06.008.

Dany, Bernd. 1988. *Selbstgemachtes Aus Bienenprodukten*. Germany: Ehrenwirth Verlag.

de Arauz, Luciana Juncioni, Angela Faustino Jozala, Priscila Gava Mazzola, and Thereza Christina Vessoni Penna. 2009. "Nisin Biotechnological Production and Application: A Review." *Trends in Food Science & Technology*. doi:10.1016/j.tifs.2009.01.056.

Di Pasquale, Garance, Marion Salignon, Yves Le Conte, Luc P. Belzunces, Axel Decourtye, André Kretzschmar, Séverine Suchail, Jean Luc Brunet, and Cédric Alaux. 2013. "Influence of Pollen Nutrition on Honey Bee Health: Do Pollen Quality and Diversity

Matter?" *PLoS ONE* 8 (8). doi:10.1371/journal.pone.0072016.

Di Prisco, Gennaro, Valeria Cavaliere, Desiderato Annoscia, Paola Varricchio, Emilio Caprio, Francesco Nazzi, Giuseppe Gargiulo, and Francesco Pennacchio. 2013. "Neonicotinoid Clothianidin Adversely Affects Insect Immunity and Promotes Replication of a Viral Pathogen in Honey Bees." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (46): 18466–71. doi:10.1073/pnas.1314923110.

EFSA-FEEDAP. 2012. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. EFSA J, 10 2740.

El-Ghaish, Shady, Michèle Dalgalarrondo, Yvan Choiset, Mahmoud Sitohy, Iskra Ivanova, Thomas Haertlé, and Jean-Marc Chobert. 2010. "Screening of Strains of Lactococci Isolated from Egyptian Dairy Products for Their Proteolytic Activity." *Food Chemistry* 120 (3): 758–64. doi:10.1016/j.foodchem.2009.11.007.

Endo, Akihito, Yuka Futagawa-Endo, and Leon M T Dicks. 2009. "Isolation and Characterization of Fructophilic Lactic Acid Bacteria from Fructose-Rich Niches." *Systematic and Applied Microbiology* 32 (8): 593–600. doi:10.1016/j.syapm.2009.08.002.

Endo, Akihito, and Seppo Salminen. 2013. "Honeybees and Beehives Are Rich Sources for Fructophilic Lactic Acid Bacteria." *Systematic and Applied Microbiology* 36 (6): 444–48. doi:10.1016/j.syapm.2013.06.002.

Engel, P., V. G. Martinson, and N. A. Moran. 2012. "Functional Diversity within the Simple Gut Microbiota of the Honey Bee." *Proceedings of the National Academy of Sciences*. doi:10.1073/pnas.1202970109.

Engel, P, and N A Moran. 2013a. "The Gut Microbiota of Insects - Diversity in Structure and Function." *FEMS Microbiology Reviews*, 1–37. doi:10.1111/1574-6976.12025.

———. 2013b. "The Gut Microbiota of Insects - Diversity in Structure and Function." *FEMS Microbiology Reviews*, 1–37. doi:10.1111/1574-6976.12025.

Engel, Philipp, Waldan K Kwong, and Nancy a Moran. 2013. "Frischella Perrara Gen. Nov., Sp. Nov., a Gammaproteobacterium Isolated from the Gut of the Honey Bee, Apis Mellifera." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63 (Pt 10): 3646–3651. doi:10.1099/ijs.0.049569-0.

Engel, Philipp, and Nancy A. Moran. 2013. "Functional and Evolutionary Insights into the Simple yet Specific Gut Microbiota of the Honey Bee from Metagenomic Analysis." *Gut Microbes*. doi:10.4161/gmic.22517.

Enkegaard, A, and P Kryger. 2009. "Honey Bees and Genetically Modified Plants." *Djf Rapport, Markbrug*, no. 141.

Evans, J. D., K. Aronstein, Y. P. Chen, C. Hetru, J. L. Imler, H. Jiang, M. Kanost, G. J. Thompson, Z. Zou, and D. Hultmark. 2006. "Immune Pathways and Defence Mechanisms in Honey Bees Apis Mellifera." *Insect Molecular Biology* 15 (5): 645–56. doi:10.1111/j.1365-2583.2006.00682.x.

Evans, J D, and J S Pettis. 2005. "Colony-Level Impacts of Immune Responsiveness in Honey Bees, Apis Mellifera." *Evolution* 59 (10): 2270–74. doi:10.1111/j.0014-3820.2005.tb00935.x.

Evans, Jay D. 2003. "Diverse Origins of Tetracycline Resistance in the Honey Bee Bacterial Pathogen Paenibacillus Larvae." *Journal of Invertebrate Pathology* 83 (1): 46–50.

doi:10.1016/S0022-2011(03)00039-9.

Evans, Jay D., and Ryan S. Schwarz. 2011. “Bees Brought to Their Knees: Microbes Affecting Honey Bee Health.” *Trends in Microbiology*. doi:10.1016/j.tim.2011.09.003.

Evans, Jay D, and Tamieka-Nicole Armstrong. 2006. “Antagonistic Interactions between Honey Bee Bacterial Symbionts and Implications for Disease.” *BMC Ecology* 6: 4. doi:10.1186/1472-6785-6-4.

Evans, Jay D, and Dawn L Lopez. 2004. “Bacterial Probiotics Induce an Immune Response in the Honey Bee (Hymenoptera: Apidae).” *Journal of Economic Entomology* 97 (3): 752–56. doi:10.1603/0022-0493(2004)097[0752:BPIAIR]2.0.CO;2.

Foley, Kirsten, Géraldine Fazio, Annette B. Jensen, and William O H Hughes. 2014. “The Distribution of Aspergillus Spp. Opportunistic Parasites in Hives and Their Pathogenicity to Honey Bees.” *Veterinary Microbiology* 169 (3–4): 203–10. doi:10.1016/j.vetmic.2013.11.029.

Forsgren, Eva. 2010. “European Foulbrood in Honey Bees.” *Journal of Invertebrate Pathology* 103 (SUPPL. 1). doi:10.1016/j.jip.2009.06.016.

Forsgren, Eva, Tobias C Olofsson, Alejandra Vásquez, and Ingemar Fries. 2009. “Novel Lactic Acid Bacteria Inhibiting Paenibacillus Larvaein Honey Bee Larvae.” *Apidologie* 41 (1): 99–108. doi:10.1051/apido/2009065.

Foster, Leonard J. 2011. “Interpretation of Data Underlying the Link between Colony Collapse Disorder (CCD) and an Invertebrate Iridescent Virus.” *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* 10 (3): M110.006387. doi:10.1074/mcp.M110.006387.

Freitak, Dalial, Indrek Ots, Alo Vanatoa, and Peeter Hõrak. 2003. “Immune Response Is Energetically Costly in White Cabbage Butterfly Pupae.” *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society* 270 Suppl (Suppl_2): S220-2. doi:10.1098/rsbl.2003.0069.

Fries, Ingemar, Marie-Pierre Chauzat, Yan-Ping Ping Chen, Vincent Doublet, Elke Genersch, Sebastian Gisder, Mariano Higes, et al. 2013. “Standard Methods for Nosema Research.” *Journal of Apicultural Research* 52 (1): 1–28. doi:10.3896/IBRA.1.52.1.14.

Fujiyuki, T., H. Takeuchi, M. Ono, S. Ohka, T. Sasaki, A. Nomoto, and T. Kubo. 2004. “Novel Insect Picorna-Like Virus Identified in the Brains of Aggressive Worker Honeybees.” *Journal of Virology*. doi:10.1128/JVI.78.3.1093-1100.2004.

Fürst, M a, D P McMahon, J L Osborne, R J Paxton, and M J F Brown. 2014. “Disease Associations between Honeybees and Bumblebees as a Threat to Wild Pollinators.” *Nature* 506 (7488): 364–66. doi:10.1038/nature12977.

Gallai, Nicola, Jean Michel Salles, Josef Settele, and Bernard E. Vaissière. 2009. “Economic Valuation of the Vulnerability of World Agriculture Confronted with Pollinator Decline.” *Ecological Economics* 68 (3): 810–21. doi:10.1016/j.ecolecon.2008.06.014.

Gätschenberger, Heike, Klara Azzami, Jürgen Tautz, and Hildburg Beier. 2013. “Antibacterial Immune Competence of Honey Bees (Apis Mellifera) Is Adapted to Different Life Stages and Environmental Risks.” *PLoS ONE* 8 (6). doi:10.1371/journal.pone.0066415.

Genersch, Elke. 2010. “American Foulbrood in Honeybees and Its Causative Agent, Paenibacillus Larvae.” *Journal of Invertebrate Pathology* 103 (SUPPL. 1). doi:10.1016/j.jip.2009.06.015.

Genersch, Elke, and Michel Aubert. 2010. “Emerging and Re-Emerging Viruses of the Honey Bee (Apis Mellifera L.).” *Veterinary Research*. doi:10.1051/vetres/2010027.

Gilliam, M., Lorenz, B.J., Richardson, G.V. 1988. “Digestive Enzymes and Micro-Organisms in Honey Bees, Apis Mellifera : Influence of Streptomycin, Age, Season and Pollen.” *Microbio* 55: 95–114.

Gilliam, M. 1979. “Microbiology of Pollen and Bee Bread: The Yeasts.” *Apidologie* 10 (1): 43–53. doi:10.1051/apido:19790304.

Gilliam, Martha. 1997. “Identification and Roles of Non-Pathogenic Microflora Associated with Honey Bees.” *FEMS Microbiology Letters*. doi:10.1016/S0378-1097(97)00337-6.

Gilliam, Martha, and Diane K. Valentine. 1974. “Enterobacteriaceae Isolated from Foraging Worker Honey Bees, Apis Mellifera.” *Journal of Invertebrate Pathology*. doi:10.1016/0022-2011(74)90069-X.

Giraffa, G., and E. Neviani. 2000. “Molecular Identification and Characterization of Food-Associated Lactobacilli.” *Italian Journal of Food Science*.

Glass, N. L., and G. C. Donaldson. 1995. “Development of Primer Sets Designed for Use with the PCR to Amplify Conserved Genes from Filamentous Ascomycetes.” *Applied and Environmental Microbiology* 61 (4): 1323–30.

González, G., M. J. Hinojo, R. Mateo, A. Medina, and M. Jiménez. 2005. “Occurrence of Mycotoxin Producing Fungi in Bee Pollen.” *International Journal of Food Microbiology* 105 (1): 1–9. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.05.001.

González-Santoyo, Isaac, and Alex Córdoba-Aguilar. 2012. “Phenoloxidase: A Key Component of the Insect Immune System.” *Entomologia Experimentalis et Applicata*. doi:10.1111/j.1570-7458.2011.01187.x.

Goulson, Dave. 2003. “EFFECTS OF INTRODUCED BEES\rON NATIVE ECOSYSTEMS\r.” *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 34: 1–26.

Gregorc, Aleš, Jay D Evans, Mike Scharf, and James D Ellis. 2012. “Gene Expression in Honey Bee (Apis Mellifera) Larvae Exposed to Pesticides and Varroa Mites (Varroa Destructor).” *Journal of Insect Physiology* 58 (8): 1042–49. doi:10.1016/j.jinsphys.2012.03.015.

Gurban Oglu Gulahmadov, Saib, Batjargal Batdorj, Michèle Dalgalarrondo, Jean Marc Chobert, Akif Alekper Oglu Kuliev, and Thomas Haertlé. 2006. “Characterization of Bacteriocin-like Inhibitory Substances (BLIS) from Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Azerbaijani Cheeses.” *European Food Research and Technology* 224 (2): 229–35. doi:10.1007/s00217-006-0338-5.

Gurgulova, K. 2003. “A Stady on Antibacterial Activity of Riphampizyn against Bee Disease Microorganisms.” *Uludag Bee Journal* 11: 40–41.

Hendriksma, Harmen P, Stephan Härtel, Ingolf C7 - e28174 Steffan-Dewenter, S Hartel, and Ingolf C7 - e28174 Steffan-Dewenter. 2011. “Testing Pollen of Single and Stacked Insect-Resistant Bt-Maize on In Vitro Reared Honey Bee Larvae.” *Plos One* 6 (12): e28174. doi:10.1371/journal.pone.0028174.

Herbert, Elton W, Bioenvironmental Bee, and H Shimanuki. 1978. “CHEMICAL COMPOSITION AND NUTRITIVE VALUE OF BEE-COLLECTED AND BEE-STORED POLLEN.” *Apidologie* 9 (1): 33–40. doi:10.1051/apido:19780103.

Higes, Mariano, Raquel Martín-Hernández, Cristina Botías, Encarna Garrido Bailón, Amelia

V. González-Porto, Laura Barrios, M. Jesús Del Nozal, et al. 2008. "How Natural Infection by Nosema Ceranae Causes Honeybee Colony Collapse." *Environmental Microbiology* 10 (10): 2659–69. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01687.x.

Hoffmann, Jules A. 2003. "The Immune Response of Drosophila." *Nature* 426 (6962): 33–38. doi:10.1038/nature02021.

Hrassnigg, Norbert, Robert Brodschneider, Paul H. Fleischmann, and Karl Crailsheim. 2005. "Unlike Nectar Foragers, Honeybee Drones (Apis Mellifera) Are Not Able to Utilize Starch as Fuel for Flight." *Apidologie* 36 (4): 547–57. doi:10.1051/apido:2005042.

Huang, Zachary. 2012. "Pollen Nutrition Affects Honey Bee Stress Resistance." *Terrestrial Arthropod Reviews* 5 (2): 175–89. doi:10.1163/187498312X639568.

Huey, B., and J. Hall. 1989. "Hypervariable DNA Fingerprinting in Escherichia Coli: Minisatellite Probe from Bacteriophage M13." *Journal of Bacteriology* 171 (5): 2528–32.

Human, Hannelie, Robert Brodschneider, Vincent Dietemann, Galen Dively, James D. Ellis, Eva Forsgren, Ingemar Fries, et al. 2013. "Miscellaneous Standard Methods for Apis Mellifera Research." *Journal of Apicultural Research* 52 (4): 1–56. doi:10.3896/IBRA.1.52.4.10.

Human, Hannelie, and Sue W. Nicolson. 2006. "Nutritional Content of Fresh, Bee-Collected and Stored Pollen of Aloe Greatheadii Var. Davyana (Asphodelaceae)." *Phytochemistry* 67 (14): 1486–92. doi:10.1016/j.phytochem.2006.05.023.

Hwanhlem, Noraphat, Vanessa Biscola, Shady El-Ghaish, Emmanuel Jaffres, Xavier Dousset, Thomas Haertle, Aran H-Kittikun, and Jean-Marc Chobert. 2013. "Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria Isolated from Mangrove Forests in Southern Thailand as Potential Bio-Control Agents: Purification and Characterization of Bacteriocin Produced by Lactococcus Lactis Subsp Lactis KT2W2L." *PROBIOTICS AND ANTIMICROBIAL PROTEINS* 5 (4): 264–78. doi:10.1007/s12602-013-9150-2.

Hwanhlem, Noraphat, Jean Marc Chobert, and Aran H-Kittikun. 2014. "Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria Isolated from Mangrove Forests in Southern Thailand as Potential Bio-Control Agents in Food: Isolation, Screening and Optimization." *Food Control* 41 (1): 202–11. doi:10.1016/j.foodcont.2014.01.021.

Ilyasov, Rustem a., Louisa R. Gaifullina, Elena S. Saltykova, Aleksandr V. Poskryakov, and Alexei G. Nikolenko. 2012. "Review of the Expression of Antimicrobial Peptide Defensin in Honey Bees Apis Mellifera L." *Journal of Apicultural Science* 56 (1): 115–24. doi:10.2478/v10289-012-0013-y.

Iqbal, Javaid, and Uli Mueller. 2007. "Virus Infection Causes Specific Learning Deficits in Honeybee Foragers." *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society* 274 (1617): 1517–21. doi:10.1098/rspb.2007.0022.

Jaouani, I., M. S. Abbassi, V. Alessandria, J. Bouraoui, R. Ben Salem, H. Kilani, R. Mansouri, L. Messadi, and L. Cocolin. 2014. "High Inhibition of Paenibacillus Larvae and Listeria Monocytogenes by Enterococcus Isolated from Different Sources in Tunisia and Identification of Their Bacteriocin Genes." *Letters in Applied Microbiology* 59 (1): 17–25. doi:10.1111/lam.12239.

Jenkins, Claire, Alleyna P. Claxton, Robert J. Shorten, Timothy D. McHugh, and Stephen H. Gillespie. 2005. "Rifampicin Resistance in Tuberculosis Outbreak, London, England." *Emerging Infectious Diseases* 11 (6): 931–34. doi:10.3201/eid1106.050118.

Johnson, Reed M., Marion D. Ellis, Christopher a. Mullin, and Maryann Frazier. 2010. "Review Article Pesticides and Honey Bee Toxicity – USA." *Apidologie* 41: 312–31. doi:10.1051/apido/2010018.

Katherine Aronstein, Eduardo Saldivar. 2005. "Characterization of a Honey Bee Toll Related Receptor Gene Am18w and Its Potential Involvement in Antimicrobial Immune Defense." *Apidologie* 36 (1): 3–14.

Kaufmann, A, and A Kaenzig. 2004. "Contamination of Honey by the Herbicide Asulam and Its Antibacterial Active Metabolite Sulfanilamide." *Food Additives and Contaminants* 21 (6): 564–71. doi:10.1080/02652030410001677790.

Keller, Irene, Peter Fluri, and Anton Imdorf. 2005. "Pollen Nutrition and Colony Development in Honey Bees : Part I." *Bee World* 86 (1): 3–10. doi:10.1080/0005772X.2005.11099641.

Kim, So-Young, Yasuki Ogawa, and Yoshikazu Adachi. 2006. "Canine Intestinal Lactic Acid Bacteria Agglutinated with Concanavalin A." *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science* 68 (12): 1351–54. doi:10.1292/jvms.68.1351.

Klatt, Björn K, Andrea Holzschuh, Catrin Westphal, Yann Clough, Inga Smit, Elke Pawelzik, and Teja Tscharntke. 2014. "Bee Pollination Improves Crop Quality, Shelf Life and Commercial Value." *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society* 281 (1775): 20132440. doi:10.1098/rspb.2013.2440.

Klein, Alexandra-Maria, Bernard E Vaissière, James H Cane, Ingolf Steffan-Dewenter, Saul A Cunningham, Claire Kremen, and Teja Tscharntke. 2007. "Importance of Pollinators in Changing Landscapes for World Crops." *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society* 274 (1608): 303–13. doi:10.1098/rspb.2006.3721.

Koch, H., and P. Schmid-Hempel. 2011. "Socially Transmitted Gut Microbiota Protect Bumble Bees against an Intestinal Parasite." *Proceedings of the National Academy of Sciences*. doi:10.1073/pnas.1110474108.

Köhler, Gerwald a., Senait Assefa, and Gregor Reid. 2012. "Probiotic Interference of *Lactobacillus Rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus Reuteri* RC-14 with the Opportunistic Fungal Pathogen *Candida Albicans*." *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* 2012: 1–14. doi:10.1155/2012/636474.

Kotthoff, Ulrich, Torsten Wappler, and Michael S. Engel. 2013. "Greater Past Disparity and Diversity Hints at Ancient Migrations of European Honey Bee Lineages into Africa and Asia." *Journal of Biogeography* 40 (10): 1832–38. doi:10.1111/jbi.12151.

Krell, R. 1996. *Value-Added Producs from Beekeeping*. *FAO Agriculture Services Bulletin*.

Krupke, Christian H., Greg J. Hunt, Brian D. Eitzer, Gladys Andino, and Krispn Given. 2012. "Multiple Routes of Pesticide Exposure for Honey Bees Living near Agricultural Fields." *PLoS ONE* 7 (1). doi:10.1371/journal.pone.0029268.

Kulic, Milan, Nevenka Aleksic, Zoran Stanimirovic, Sinisa Ristic, and Snezana Medenica. 2009. "Examination of Genotoxic Effects of Fumagillin in Vivo." *Genetika*. doi:10.2298/GENSR0903329K.

Kvavadze, Eliso, Irina Gambashidze, Giorgi Mindiashvili, and Giorgi Gogochuri. 2007. "The First Find in Southern Georgia of Fossil Honey from the Bronze Age, Based on Palynological Data." *Vegetation History and Archaeobotany* 16 (5): 399–404. doi:10.1007/s00334-006-0067-5.

Lee, Fredrick J., Douglas B. Rusch, Frank J. Stewart, Heather R. Mattila, and Irene L G Newton. 2014. "Saccharide Breakdown and Fermentation by the Honey Bee Gut Microbiome." *Environmental Microbiology*. doi:10.1111/1462-2920.12526.

Lehane, M J. 1997. "Peritrophic Matrix Structure and Function." *Annual Review of Entomology* 42: 525–50. doi:10.1146/annurev.ento.42.1.525.

Levy, Stuart B., and Bonnie M. Marshall. 2013. "Honeybees and Tetracycline Resistance." *mBio*. doi:10.1128/mBio.00045-13.

Liu, C. H., C. S. Chiu, P. L. Ho, and S. W. Wang. 2009. "Improvement in the Growth Performance of White Shrimp, Litopenaeus Vannamei, by a Protease-Producing Probiotic, Bacillus Subtilis E20, from Natto." *Journal of Applied Microbiology* 107 (3): 1031–41. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04284.x.

Loper, G.M., L.N. Standifer, M.J. Thompson, and Martha Gilliam. 1980. "BIOCHEMISTRY AND MICROBIOLOGY OF BEE-COLLECTED ALMOND (PRUNUS DULCIS) POLLEN AND BEE BREAD L - Fatty Acids, Sterols, Vitamins and Minerals." *Apidologie* 11 (1): 63–73. doi:10.1051/fruits:2001123.

Lourenĉo, Anete P., Juliana R. Martins, Márcia M G Bitondi, and Zilá L P Simões. 2009. "Trade-off between Immune Stimulation and Expression of Storage Protein Genes." *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 71 (2): 70–87. doi:10.1002/arch.20301.

Lozupone, Catherine A., Jesse I. Stombaugh, Jeffrey I. Gordon, Janet K. Jansson, and Rob Knight. 2012. "Diversity, Stability and Resilience of the Human Gut Microbiota." *Nature*. doi:10.1038/nature11550.

M. L. Wilson. 1987. *The Biology of the Honey Bee*. Harvard University Press.

Malone, L A, and E P J Burgess. 2009. "Impact of Genetically Modified Crops on Pollinators." *Environmental Impact of Genetically Modified Crops*, 199–224. doi:10.1079/9781845934095.0199.

Marco, Maria L., Sonia Pavan, and Michiel Kleerebezem. 2006. "Towards Understanding Molecular Modes of Probiotic Action." *Current Opinion in Biotechnology*. doi:10.1016/j.copbio.2006.02.005.

Margaoan, Rodica, Liviu A Marghitas, Daniel Dezmirean, Cristina M Mihai, and Otilia Bobis. 2010. "Bee Collected Pollen - General Aspects and Chemical Composition." *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies* 67: 1–2.

Martin, S. J., A. C. Highfield, L. Brettell, E. M. Villalobos, G. E. Budge, M. Powell, S. Nikaido, and D. C. Schroeder. 2012. "Global Honey Bee Viral Landscape Altered by a Parasitic Mite." *Science*. doi:10.1126/science.1220941.

Martínez, Inés, Diahann J. Perdicaro, Andrew W. Brown, Susan Hammons, Trevor J. Carden, Timothy P. Carr, Kent M. Eskridge, and Jens Walter. 2013. "Diet-Induced Alterations of Host Cholesterol Metabolism Are Likely to Affect the Gut Microbiota Composition in Hamsters." *Applied and Environmental Microbiology* 79 (2): 516–24. doi:10.1128/AEM.03046-12.

Martinson, Vincent G., Bryan N. Danforth, Robert L. Minckley, Olav Rueppell, Salim Tingek, and Nancy A. Moran. 2011. "A Simple and Distinctive Microbiota Associated with Honey Bees and Bumble Bees." *Molecular Ecology* 20 (3): 619–28. doi:10.1111/j.1365-294X.2010.04959.x.

Mathur, Shalini, and Rameshwar Singh. 2005. "Antibiotic Resistance in Food Lactic Acid Bacteria - A Review." *International Journal of Food Microbiology* 105 (3): 281–95.

doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.008.

Mattila, H R, and G W Otis. 2006. “Influence of Pollen Diet in Spring on Development of Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Colonies.” *Journal of Economic Entomology* 99 (3): 604–13. doi:10.1603/0022-0493-99.3.604.

Mattila, Heather R., Daniela Rios, Victoria E. Walker-Sperling, Guus Roeselers, and Irene L G Newton. 2012. “Characterization of the Active Microbiotas Associated with Honey Bees Reveals Healthier and Broader Communities When Colonies Are Genetically Diverse.” *PLoS ONE* 7 (3). doi:10.1371/journal.pone.0032962.

Mazmanian, Sarkis K., Hua Liu Cui, Arthur O. Tzianabos, and Dennis L. Kasper. 2005. “An Immunomodulatory Molecule of Symbiotic Bacteria Directs Maturation of the Host Immune System.” *Cell* 122 (1): 107–18. doi:10.1016/j.cell.2005.05.007.

Medzhitov, Ruslan. 2007. “Recognition of Microorganisms and Activation of the Immune Response.” *Nature* 449 (7164): 819–26. doi:10.1038/nature06246.

Meeus, Ivan, Vicky Vercruysse, and Guy Smagghe. 2012. “Molecular Detection of Spiroplasma Apis and Spiroplasma Melliferum in Bees.” *Journal of Invertebrate Pathology* 109 (1): 172–74. doi:10.1016/j.jip.2011.11.006.

Menzel, Randolf, and Uwe Greggers. 2013. “Guidance by Odors in Honeybee Navigation.” *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 199 (10): 867–73. doi:10.1007/s00359-013-0850-6.

Moore, Authors Philip A, Michael E Wilson, and John A Skinner. 2015. “Honey Bee Viruses , the Deadly Varroa Mite Associates.” http://www.extension.org/pages/71172/honey-bee-viruses-the-deadly-varroa-mite-associates.

Moore, Jonathan, Aleksey Jironkin, David Chandler, Nigel Burroughs, David J. Evans, and Eugene V. Ryabov. 2011. “Recombinants between Deformed Wing Virus and Varroa Destructor Virus-1 May Prevail in Varroa Destructor-Infested Honeybee Colonies.” *Journal of General Virology* 92 (1): 156–61. doi:10.1099/vir.0.025965-0.

Moran, Nancy a. 2015. “Genomics of the Honey Bee Microbiome.” *Current Opinion in Insect Science*. Elsevier Inc, 1–7. doi:10.1016/j.cois.2015.04.003.

Moran, Nancy A., Allison K. Hansen, J. Elijah Powell, and Zakee L. Sabree. 2012. “Distinctive Gut Microbiota of Honey Bees Assessed Using Deep Sampling from Individual Worker Bees.” *PLoS ONE* 7 (4). doi:10.1371/journal.pone.0036393.

Morimoto, Tomomi, Yuriko Kojima, Taku Toki, Yayoi Komeda, Mikio Yoshiyama, Kiyoshi Kimura, Keijiro Nirasawa, and Tatsuhiko Kadowaki. 2011. “The Habitat Disruption Induces Immune-Suppression and Oxidative Stress in Honey Bees.” *Ecology and Evolution* 1 (2): 201–17. doi:10.1002/ece3.21.

Murray, K Daniel, and Katherine A Aronstein. 2006. “Oxytetracycline-Resistance in the Honey Bee Pathogen Paenibacillus Larvae Is Encoded on Novel Plasmid pMA67.” *Journal of Apicultural Research* 45 (3): 207–14. doi:10.3896/IBRA.1.45.4.07.

Neeser, J R, D Granato, M Rouvet, A Servin, S Teneberg, and K A Karlsson. 2000. “Lactobacillus Johnsonii La1 Shares Carbohydrate-Binding Specificities with Several Enteropathogenic Bacteria.” *Glycobiology* 10 (11): 1193–99.

Neveling, Deon P., Akihito Endo, and Leon M T Dicks. 2012. “Fructophilic Lactobacillus Kunkeei and Lactobacillus Brevis Isolated from Fresh Flowers, Bees and Bee-Hives.” *Current Microbiology* 65 (5): 507–15. doi:10.1007/s00284-012-0186-4.

Nicolson, Susan W. 2011. “Bee Food: The Chemistry and Nutritional Value of Nectar, Pollen and Mixtures of the Two.” *African Zoology*. doi:10.3377/004.046.0201.

O’Toole, Paul W, and Jakki C Cooney. 2008. “Probiotic Bacteria Influence the Composition and Function of the Intestinal Microbiota.” *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases* 2008: 175285. doi:10.1155/2008/175285.

Ocaña, Virginia S, and María Elena Nader-Macías. 2004. “Production of Antimicrobial Substances by Lactic Acid Bacteria II: Screening Bacteriocin-Producing Strains with Probiotic Purposes and Characterization of a Lactobacillus Bacteriocin.” *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 268: 347–53. doi:1-59259-766-1:347 [pii]\r10.1385/1-59259-766-1:347.

OECD. 2013. “Test No. 237: Honey Bee (Apis Mellifera) Larval Toxicity Test, Single Exposure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals.” Paris: OECD Publishing. doi:DOI: http://dx.doi.org/10.1787/9789264203723-en.

Oliveira, Ana, Marta Leite, Leon D. Kluskens, Sílvio B. Santos, Luís D. R. Melo, and Joana Azeredo. 2015. “The First Paenibacillus Larvae Bacteriophage Endolysin (PlyPl23) with High Potential to Control American Foulbrood.” *Plos One* 10 (7): e0132095. doi:10.1371/journal.pone.0132095.

Olofsson, Tobias C., and Alejandra Vásquez. 2008. “Detection and Identification of a Novel Lactic Acid Bacterial Flora within the Honey Stomach of the Honeybee Apis Mellifera.” *Current Microbiology* 57 (4): 356–63. doi:10.1007/s00284-008-9202-0.

Ortelli, D, P Edder, and C Corvi. 2004. “Analysis of Chloramphenicol Residues in Honey by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry.” *Chromatographia* 59 (1–2): 61–64. doi:10.1365/s10337-003-0132-5.

Osta, Mike A, George K Christophides, Dina Vlachou, and Fotis C Kafatos. 2004. “Innate Immunity in the Malaria Vector Anopheles Gambiae: Comparative and Functional Genomics.” *The Journal of Experimental Biology* 207 (Pt 15): 2551–63. doi:10.1242/jeb.01066.

Palacios, G, J Hui, P L Quan, a Kalkstein, K S Honkavuori, a V Bussetti, S Conlan, et al. 2008. “Genetic Analysis of Israel Acute Paralysis Virus: Distinct Clusters Are Circulating in the United States.” *Journal of Virology* 82 (13): 6209–17. doi:10.1128/JVI.00251-08.

Pettis, Jeffery S., Dennis Vanengelsdorp, Josephine Johnson, and Galen Dively. 2012. “Pesticide Exposure in Honey Bees Results in Increased Levels of the Gut Pathogen Nosema.” *Naturwissenschaften* 99 (2): 153–58. doi:10.1007/s00114-011-0881-1.

Plischuk, Santiago, Ivan Meeus, Guy Smagghe, and Carlos E. Lange. 2011. “Apicystis Bombi (Apicomplexa: Neogregarinorida) Parasitizing Apis Mellifera and Bombus Terrestris (Hymenoptera: Apidae) in Argentina.” *Environmental Microbiology Reports* 3 (5): 565–68. doi:10.1111/j.1758-2229.2011.00261.x.

Potts, S. G., S. P. M. Roberts, R. Dean, G. Marris, M. Brown, R. Jones, and J. Settele. 2009. “Declines of Managed Honey Bees and Beekeepers in Europe,” no. September 2015. doi:10.3896/IBRA.1.49.1.02.

Potts, Simon G., Jacobus C. Biesmeijer, Claire Kremen, Peter Neumann, Oliver Schweiger, and William E. Kunin. 2010. “Global Pollinator Declines: Trends, Impacts and Drivers.” *Trends in Ecology and Evolution*. doi:10.1016/j.tree.2010.01.007.

Quintana, Leonardo. 2015. “Fungal Infections In Honey Bees.” *Fungal Genomics & Biology*

5 (1): 1–4. doi:10.4172/2165-8056.1000118.

Randles, J W. 1999. “The ’ Pathosphere ’, Paradigms and Enigmatic Pathogens.” *Australasian Plant Pathology*, 263–68.

Rathcke, B. 1983. “Competition and Facilitation among Plants for Pollination.” In *Pollination Biology*, 305–29. doi:http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-583980-8.50019-3.

Rauch, Sandra, Ainura Ashiralieva, Kati Hedtke, and Elke Genersch. 2009. “Negative Correlation between Individual-Insect-Level Virulence and Colony-Level Virulence of Paenibacillus Larvae, the Etiological Agent of American Foulbrood of Honeybees.” *Applied and Environmental Microbiology* 75 (10): 3344–47. doi:10.1128/AEM.02839-08.

Residue. 2009. “2010/37/EU MRL in Foodstuffs.” *Commission Regulation (EU) No. 37/2010 on Pharmacologically Active Substances and Their Classification Regarding Maximum Residue Limits in Foodstuffs of Animal Origin.*, no. 2377. \nhttp://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-5/reg_2010_37/reg_2010_37_en.pdf.

Reybroeck, Wim, Els Daeseleire, Hubert F. De Brabander, and Lieve Herman. 2012. “Antimicrobials in Beekeeping.” *Veterinary Microbiology*. doi:10.1016/j.vetmic.2012.01.012.

Rolfe, R D. 2000. “The Role of Probiotic Cultures in the Control of Gastrointestinal Health.” *The Journal of Nutrition* 130 (2S Suppl): 396S–402S.

Rossano, Rocco, Marilena Larocca, Teresa Polito, Anna Maria Perna, Maria Carmela Padula, Giuseppe Martelli, and Paolo Riccio. 2012. “What Are the Proteolytic Enzymes of Honey and What They Do Tell Us? A Fingerprint Analysis by 2-D Zymography of Unifloral Honeys.” *PLoS ONE* 7 (11). doi:10.1371/journal.pone.0049164.

Rossetti, Lia, Domenico Carminati, Miriam Zago, and Giorgio Giraffa. 2009. “A Qualified Presumption of Safety Approach for the Safety Assessment of Grana Padano Whey Starters.” *International Journal of Food Microbiology* 130 (1): 70–73. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.003.

Rossetti, Lia, and Giorgio Giraffa. 2005. “Rapid Identification of Dairy Lactic Acid Bacteria by M13-Generated, RAPD-PCR Fingerprint Databases.” *Journal of Microbiological Methods* 63 (2): 135–44. doi:10.1016/j.mimet.2005.03.001.

Roulston, T. H., and J. H. Cane. 2000. “Pollen Nutritional Content and Digestibility for Animals.” *Plant Systematics and Evolution*. doi:10.1007/BF00984102.

Round, J. L., S. M. Lee, J. Li, G. Tran, B. Jabri, T. A. Chatila, and S. K. Mazmanian. 2011. “The Toll-like Receptor 2 Pathway Establishes Colonization by a Commensal of the Human Microbiota.” *Science* 332 (6032): 974–77. doi:10.1126/science.1206095.

Round, June L, S Melanie Lee, Jennifer Li, Gloria Tran, Bana Jabri, Talal a Chatila, and Sarkis K Mazmanian. 2011. “The Toll-Like Receptor 2 Pathway Commensal of the Human Microbiota.” *Science* 1007172 (May): 974–77.

Rouse, S., D. Harnett, a. Vaughan, and D. Van Sinderen. 2008. “Lactic Acid Bacteria with Potential to Eliminate Fungal Spoilage in Foods.” *Journal of Applied Microbiology* 104: 915–23. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03619.x.

Royet, Julien, Dipika Gupta, and Roman Dziarski. 2011. “Peptidoglycan Recognition Proteins: Modulators of the Microbiome and Inflammation.” *Nature Reviews. Immunology* 11 (12): 837–51. doi:10.1038/nri3089.

Runckel, Charles, Michelle L. Flenniken, Juan C. Engel, J. Graham Ruby, Donald Ganem, Raul Andino, and Joseph L. DeRisi. 2011. "Temporal Analysis of the Honey Bee Microbiome Reveals Four Novel Viruses and Seasonal Prevalence of Known Viruses, Nosema, and Crithidia." *PLoS ONE* 6 (6). doi:10.1371/journal.pone.0020656.

Sabaté, Daniela C., Leonor Carrillo, and M. Carina Audisio. 2009. "Inhibition of Paenibacillus Larvae and Ascosphaera Apis by Bacillus Subtilis Isolated from Honeybee Gut and Honey Samples." *Research in Microbiology* 160 (3): 193–99. doi:10.1016/j.resmic.2009.03.002.

Sabree, Zakee L., Allison K. Hansen, and Nancy A. Moran. 2012. "Independent Studies Using Deep Sequencing Resolve the Same Set of Core Bacterial Species Dominating Gut Communities of Honey Bees." *PLoS ONE* 7 (7). doi:10.1371/journal.pone.0041250.

Salminen, Seppo, and Henk van Loveren. 2012. "Probiotics and Prebiotics: Health Claim Substantiation." *Microbial Ecology in Health & Disease*. doi:10.3402/mehd.v23i0.18568.

Sammataro, D, U Gerson, and G Needham. 2000. "Parasitic Mites of Honey Bees: Life History, Implications, and Impact." *Annual Review of Entomology* 45: 519–48. doi:10.1146/annurev.ento.45.1.519.

Sanders, Mary Ellen. 2006. "Summary of Probiotic Activities of Bifidobacterium Lactis HN019." *Journal of Clinical Gastroenterology* 40 (9): 776–83. doi:10.1097/01.mcg.0000225576.73385.f0.

———. 2008. "Probiotics: Definition, Sources, Selection, and Uses." *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 46 Suppl 2: S58-NaN-S151. doi:10.1086/523341.

Savijoki, Kirsi, Hanne Ingmer, and Pekka Varmanen. 2006. "Proteolytic Systems of Lactic Acid Bacteria." *Applied Microbiology and Biotechnology*. doi:10.1007/s00253-006-0427-1.

Saxelin, Maija, Soile Tynkkynen, Tiina Mattila-Sandholm, and Willem M. De Vos. 2005. "Probiotic and Other Functional Microbes: From Markets to Mechanisms." *Current Opinion in Biotechnology*. doi:10.1016/j.copbio.2005.02.003.

Schillinger, U., and F. K. Lücke. 1989. "Antibacterial Activity of Lactobacillus Sake Isolated from Meat." *Applied and Environmental Microbiology* 55 (8): 1901–6. doi:10.1016/S0168-1605(03)00051-5.

Schneider, D. 1957. "Elektrophysiologische Untersuchungen von Chemo- Und Mechanorezeptoren Der Antenne Des Seidenspinners Bombyx Mori L." *Zeitschrift Fur Vergleichende Physiologie* 40 (1): 8–41.

Schnürer, Johan, and Jesper Magnusson. 2005. "Antifungal Lactic Acid Bacteria as Biopreservatives." In *Trends in Food Science and Technology*, 16:70–78. doi:10.1016/j.tifs.2004.02.014.

Schwarz, Ryan S., Gary R. Bauchan, Charles A. Murphy, Jorgen Ravoet, Dirk C. Graaf, and Jay D. Evans. 2015. "Characterization of Two Species of Trypanosomatidae from the Honey Bee Apis Mellifera: Crithidia Mellificae Langridge and McGhee, and Lotmaria Passim N. Gen., N. Sp." *Journal of Eukaryotic Microbiology* 62 (5): 567–583.

Schwarz, Ryan S., Qiang Huang, and Jay D. Evans. 2015. "Hologenome Theory and the Honey Bee Pathosphere." *Current Opinion in Insect Science*, no. APRIL.

doi:10.1016/j.cois.2015.04.006.

Serra Bonvehi, J., M. Soliva Torrentó, and E. Centelles Lorente. 2001. "Evaluation of Polyphenolic and Flavonoid Compounds in Honeybee-Collected Pollen Produced in Spain." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (4): 1848–53. doi:10.1021/jf0012300.

Settanni, Luca, and Aldo Corsetti. 2008. "Application of Bacteriocins in Vegetable Food Biopreservation." *International Journal of Food Microbiology*. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.09.001.

Shen, Miaoqing, Xiaolong Yang, Diana Cox-Foster, and Liwang Cui. 2005. "The Role of Varroa Mites in Infections of Kashmir Bee Virus (KBV) and Deformed Wing Virus (DWV) in Honey Bees." *Virology* 342 (1): 141–49. doi:10.1016/j.virol.2005.07.012.

Singh, Rajwinder, Abby L. Levitt, Edwin G. Rajotte, Edward C. Holmes, Nancy Ostiguy, Dennis Vanengelsdorp, W. Ian Lipkin, Claude W. Depamphilis, Amy L. Toth, and Diana L. Cox-Foster. 2010. "RNA Viruses in Hymenopteran Pollinators: Evidence of Inter-Taxa Virus Transmission via Pollen and Potential Impact on Non-Apis Hymenopteran Species." *PLoS ONE* 5 (12). doi:10.1371/journal.pone.0014357.

Slessor, Keith N., Mark L. Winston, and Yves Le Conte. 2005. "Pheromone Communication in the Honeybee (Apis Mellifera L.)." *Journal of Chemical Ecology* 31 (11): 2731–45. doi:10.1007/s10886-005-7623-9.

Stanimirovic, Zoran, Jevrosima Stevanovic, Vladan Bajic, and Ivica Radovic. 2007. "Evaluation of Genotoxic Effects of Fumagillin by Cytogenetic Tests in Vivo." *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 628 (1): 1–10. doi:10.1016/j.mrgentox.2006.09.014.

Steinmann, Nadja, Miguel Corona, Peter Neumann, and Benjamin Dainat. 2015. "Overwintering Is Associated with Reduced Expression of Immune Genes and Higher Susceptibility to Virus Infection in Honey Bees." *Plos One* 10 (6): e0129956. doi:10.1371/journal.pone.0129956.

Tarpy, David R., Heather R. Mattila, and Irene L.G. Newton. 2015. "Characterization of the Honey Bee Microbiome throughout the Queen-Rearing Process." *Applied and Environmental Microbiology* 81 (9): AEM.00307-15. doi:10.1128/AEM.00307-15.

Thorp, Robbin W. 1979. "Structural, Behavioral, and Physiological Adaptations of Bees (Apoidea) for Collecting Pollen." *ANN. MISSOURI BOT. GARD.* 66 (4): 788–812. doi:10.2307/2398919.

Tian, Baoyu, Nibal H. Fadhil, J. Elijah Powell, Waldan K. Kwong, and Nancy A. Moran. 2012. "Long-Term Exposure to Antibiotics Has Caused Accumulation of Resistance Determinants in the Gut Microbiota of Honeybees." *mBio* 3 (6). doi:10.1128/mBio.00377-12.

Tokarz, Rafal, Cadhla Firth, Craig Street, Diana L. Cox-Foster, and W. Ian Lipkin. 2011. "Lack of Evidence for an Association between Iridovirus and Colony Collapse Disorder." *PLoS ONE* 6 (6). doi:10.1371/journal.pone.0021844.

Touhara, Kazushige, and Leslie B. Vosshall. 2009. "Sensing Odorants and Pheromones with Chemosensory Receptors." *Annual Review of Physiology* 71 (1): 307–32. doi:10.1146/annurev.physiol.010908.163209.

Valdivia, Raphael H, and Raphael H Valdivia. 2004. "Modeling the Function of Bacterial Virulence Factors in." *Society* 3 (4): 827–34. doi:10.1128/EC.3.4.827.

Vandervalk, L P, and M E Nasr. 2014. “New Miticides for Integrated Pest Management of Varroa Destructor (Acari : Varroidae) in Honey Bee Colonies on the Canadian Prairies,” 2030–36.

vanEngelsdorp, Dennis, Jay D. Evans, Leo Donovall, Chris Mullin, Maryann Frazier, James Frazier, David R. Tarpy, Jerry Hayes, and Jeffery S. Pettis. 2009. “‘Entombed Pollen’: A New Condition in Honey Bee Colonies Associated with Increased Risk of Colony Mortality.” *Journal of Invertebrate Pathology* 101 (2): 147–49. doi:10.1016/j.jip.2009.03.008.

vanEngelsdorp, Dennis, Jay D. Evans, Claude Saegerman, Chris Mullin, Eric Haubruge, Bach Kim Nguyen, Maryann Frazier, et al. 2009. “Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study.” *PLoS ONE* 4 (8). doi:10.1371/journal.pone.0006481.

Vásquez, Alejandra, Eva Forsgren, Ingemar Fries, Robert J. Paxton, Emilie Flaberg, Laszlo Szekely, and Tobias C. Olofsson. 2012. “Symbionts as Major Modulators of Insect Health: Lactic Acid Bacteria and Honeybees.” *PLoS ONE* 7 (3). doi:10.1371/journal.pone.0033188.

Vásquez, Alejandra, and Tobias C. Olofsson. 2009. “The Lactic Acid Bacteria Involved in the Production of Bee Pollen and Bee Bread.” *Journal of Apicultural Research*. doi:10.3896/IBRA.1.48.3.07.

Verstraete, Willy, L. Wittebolle, K. Heylen, B. Vanparys, P. de Vos, T. van de Wiele, and N. Boon. 2007. “Microbial Resource Management: The Road to Go for Environmental Biotechnology.” *Engineering in Life Sciences*. doi:10.1002/elsc.200620176.

Vidal, Jose Luis Martínez, María Del Mar Aguilera-Luiz, Roberto Romero-González, and Antonia Garrido Frenich. 2009. “Multiclass Analysis of Antibiotic Residues in Honey by Ultraperformance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (5): 1760–67. doi:10.1021/jf8034572.

Vinderola, C. G., and J. A. Reinheimer. 2003. “Lactic Acid Starter and Probiotic Bacteria: A Comparative ‘in Vitro’ study of Probiotic Characteristics and Biological Barrier Resistance.” *Food Research International* 36 (9–10): 895–904. doi:10.1016/S0963-9969(03)00098-X.

Vojvodic, Svjetlana, Jacobus J Boomsma, Jørgen Eilenberg, and Annette B Jensen. 2012. “Virulence of Mixed Fungal Infections in Honey Bee Brood.” *Frontiers in Zoology*. doi:10.1186/1742-9994-9-5.

Vojvodic, Svjetlana, Sandra M Rehan, and Kirk E Anderson. 2013. “Microbial Gut Diversity of Africanized and European Honey Bee Larval Instars.” *PloS One* 8 (8): e72106. doi:10.1371/journal.pone.0072106.

Wang, P, and R R Granados. 1997. “An Intestinal Mucin Is the Target Substrate for a Baculovirus Enhancin.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (13): 6977–82. doi:10.1073/pnas.94.13.6977.

Wang, Yi-Peng, and Ren Lai. 2010. “Insect Antimicrobial Peptides: Structures, Properties and Gene Regulation.” *Dong Wu Xue Yan Jiu = Zoological Research / “Dong Wu Xue Yan Jiu” bian Ji We Yuan Hui Bian Ji* 31 (1): 27–34. doi:10.3724/SP.J.1141.2010.01027.

Weinstock, George M. 2006. “Insights into Social Insects from the Genome of the Honeybee Apis Mellifera.” *Nature*. doi:10.1038/nature05260.

White, T. J., S. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. “Amplification and Direct Sequencing of

Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics." In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, 315–22. doi:citeulike-article-id:671166.

Williams, Geoffrey R, Cédric Alaux, Cecilia Costa, Támas Csáki, Vincent Doublet, Dorothea Eisenhardt, Ingemar Fries, et al. 2013. "Standard Methods for Maintaining Adult Apis Mellifera in Cages under in Vitro Laboratory Conditions." *Journal of Apicultural Research* 52 (1): 1–36. doi:10.3896/IBRA.1.52.1.04.

Wilson-Rich, Noah, Marla Spivak, Nina H Fefferman, and Philip T Starks. 2009. "Genetic, Individual, and Group Facilitation of Disease Resistance in Insect Societies." *Annual Review of Entomology* 54: 405–23. doi:10.1146/annurev.ento.53.103106.093301.

Wu, Judy Y., Matthew D. Smart, Carol M. Anelli, and Walter S. Sheppard. 2012. "Honey Bees (Apis Mellifera) Reared in Brood Combs Containing High Levels of Pesticide Residues Exhibit Increased Susceptibility to Nosema (Microsporidia) Infection." *Journal of Invertebrate Pathology* 109 (3): 326–29. doi:10.1016/j.jip.2012.01.005.

Wu, Meihua, and Yuya Sugimura. 2013. "Honeybee Gastrointestinal Bacteria for Novel and Sustainable Disease Control Strategies." *Journal of Developments in Sustainable Agriculture* 90: 85–90. http://jlc.jst.go.jp/DN/JST.JSTAGE/jdsa/8.85?from=Google.

Wu, Meihua, Yuya Sugimura, Noriko Takaya, Daisuke Takamatsu, Masaru Kobayashi, DeMar Taylor, and Mikio Yoshiyama. 2013. "Characterization of Bifidobacteria in the Digestive Tract of the Japanese Honeybee, Apis Cerana Japonica." *Journal of Invertebrate Pathology* 112 (1): 88–93. doi:10.1016/j.jip.2012.09.005.

Yang, Xiaolong, and Diana L Cox-Foster. 2005. "Impact of an Ectoparasite on the Immunity and Pathology of an Invertebrate: Evidence for Host Immunosuppression and Viral Amplification." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (21): 7470–75. doi:10.1073/pnas.0501860102.

Yoshiyama, Mikio, Meihua Wu, Yuya Sugimura, Noriko Takaya, Hiromi Kimoto-Nira, and Chise Suzuki. 2013. "Inhibition of Paenibacillus Larvae by Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Materials." *Journal of Invertebrate Pathology* 112 (1): 62–67. doi:10.1016/j.jip.2012.09.002.

Zago, Miriam, Maria Emanuela Fornasari, Domenico Carminati, Patricia Burns, Viviana Suàrez, Gabriel Vinderola, Jorge Reinheimer, and Giorgio Giraffa. 2011. "Characterization and Probiotic Potential of Lactobacillus Plantarum Strains Isolated from Cheeses." *Food Microbiology* 28 (5): 1033–40. doi:10.1016/j.fm.2011.02.009.

Zilber-Rosenberg, Ilana, and Eugene Rosenberg. 2008. "Role of Microorganisms in the Evolution of Animals and Plants: The Hologenome Theory of Evolution." *FEMS Microbiology Reviews*. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00123.x.

"ქართული თაფლის 100-მდე ნიმუში ლაბორატორიულ შემოწმებას რიგაში გაივლის." 2014. *Europe for Georgia*. http://eugeorgia.info/ka/article/134/qartuli-taflis-100-mde-nimushi-laboratoriul-shemowmebas-rigashi-gaivlis/.