სპორაწარმომქმნელი პრობიოტიკების წარმოების ტექნოლოგიის შემუშავება და მეფუტკრეობაში მათი გამოყენების შესაძლებლობა

კახა სოხაძე

სადისერტაციო ნაშრომი წარმოდგენილია
საქართველოს აგრარული უნივერსიტეტის
აგრარულ მეცნიერებების საბჭოზე
აგრარულ მეცნიერებათა დოქტორის აკადემიური ხარისხის
მოსაპოვებლად

სამეცნიერო ხელმძღვანელი: ვლადიმერ ელისაშვილი, ბიოლოგიურ მეცნიერებათა დოქტორი, პროფესორი

საქართველოს აგრარული უნივერსიტეტი
თბილისი, 2019

საქართველოს აგრარული უნივერსიტეტი

სადოქტორო სკოლა

ვეტერინარიის სამეცნიერო მიმართულების კომისიის რეკომენდაცია

დისერტანტი: კახა სოხაძე /ხელმოწერა/_____

დისერტაციის სათაური: სპორაწარმომქმნელი პრობიოტიკების წარმოების ტექნოლოგიის შემუშავება და მეფუტკრეობაში მათი გამოყენების შესაძლებლობა

დისერტაციის დაცვის თარიღი: 06.12.2019

რეცენზენტი 1: ლევან გულუა /ხელმოწერა/_____

რეცენზენტი 2: ნინო გაგელიძე /ხელმოწერა/_____

დაცვის კომისიის თავმჯდომარე: ანა ბოკუჩავა /ხელმოწერა/_____

დაცვის კომისიის წევრი: კახა დიდებულიძე /ხელმოწერა/_____

დაცვის კომისიის წევრი: ბესარიონ ლასარეიშვილი /ხელმოწერა/_____

დაცვის კომისიის წევრი: ვლადიმერ ელისაშვილი /ხელმოწერა/_____

რეკომენდებულია დაცვისათვის ვეტერინარიის სამეცნიერო მიმართულების კომისიის მიერ.

თავჯდომარე: ანა ბოკუჩავა /ხელმოწერა/_____

წევრი: გიორგი ზაალიშვილი /ხელმოწერა/_____

წევრი: გიორგი მელაშვილი /ხელმოწერა/_____

სადოქტორო სკოლის კოორდინატორი:
ნატო კობახიძე /ხელმოწერა/_____

თარიღი: 16.09.2019

ავტორის დეკლარაცია

„როგორც წარმოდგენილი სადოქტორო დისერტაციის ავტორი, ვაცხადებ, რომ ჩემი დისერტაცია წარმოადგენს ორიგინალურ ნაშრომს და მასში სხვა ავტორების აქამდე გამოქვეყნებული, გამოსაქვეყნებლად მიღებული ან დასაცავად წარდგენილი მასალები გამოყენებულია ციტირების სათანადო წესების დაცვით“.

კახა სოხაძე /ხელმოწერა/_____

თარიღი: 05.11.2016

რეზიუმე

შესავალი: პრობიოტიკები წარმოადგენენ ცხოველთა პროდუქტიულობის ზრდისა და ადამიანის ჯანმრთელობის გამაუმჯობესებელ თერაპიულ, პროფილაქტიკურ და ზრდის სასურსათო/ცხოველის საკვების დანამატს, რის გამოც პრობიოტიკული სპორაწარმომქმნელი ბაქტერიების წარმოების კონკურენტუნარიანი ტექნოლოგიის შემუშავება გახადა განსაკუთრებით აქტუალური.

მიზანი: კვლევის ძირითად მიზანს წარმოადგენდა *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895-ს და *Bacillus subtilis* KATMIRA 1933-ს ზრდისა და სპორულაციის მარეგულირებელი ფიზიოლოგიური მექანიზმის შესწავლა მცენარეული ნედლეულის სიღრმული და მყარფაზოვანი ფერმენტაციის პირობებში და პრობიოტიკული პრეპარატების წარმოების ახალი ტექნოლოგიის შემუშავება.

მეთოდები: ბაცილების სიღრმული კულტივირება მიმდინარეობდა სანჯღრეველაზე „Innova 44“ და 7 ლ ტევადობის ფერმენტიორში, ხოლო მცენარეული ნედლეულის მყარფაზოვანი ფერმენტაცია - კოლბებსა და პოლიპროპილენის აირშეღწევად პარკებში.

შედეგები: დადგინდა, რომ სიღრმული ფერმენტაციისას სიმინდის კაჭეჭი და ხორბლის სპირტის წარმოების ნარჩენი არიან ზრდის საუკეთესო სუბსტრატები *B. amyloliquefaciens* B-1895-ის სპორების მაღალი გამოსავლიანობით (8.2×10^9 - 1.09×10^{10} სპორა/მლ) დაგროვებისთვის, ხოლო მანდარინის ქერქმა განაპირობა *B. subtilis* KATMIRA 1933-ის სპორების ყველაზე მაღალი გამოსავლიანობა (5.7×10^{10} სპორა/მლ). განხორციელებულმა ექსპერიმენტებმა აჩვენეს, რომ ნახშირბადის წყაროს ამოწურვა წარმოადგენს *B. subtilis* KATMIRA 1933-სა და *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს სპორულაციის ძირითად სტიმულს. პრობიოტიკების წარმოების პროცესის მასშტაბირების მიზნით ფერმენტიორში შემუშავებული კულტივირების ორეტაპიანი სტრატეგიის შედეგად მიღწეული იქნა სპორების მაქსიმალური გამოსავლიანობა - 6.5×10^{10} სპორა/მლ და 2.5×10^{10} სპორა/მლ, შესაბამისად, *B. subtilis* KATMIRA 1933-ის და *B. amyloliquefaciens* B-1895-ის კულტივირებისას.

სპირტის წარმოების ნარჩენის მყარფაზოვანი ფერმენტაციისას, სუბსტრატის ხაჭოს ან ყველის შრატით დატენიანებამ გაზარდა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს სპორების გამოსავლიანობა, შესაბამისად, 7 და 37 %-ით, კონტროლთან შედარებით.

განხორციელდა სპორაწარმოების მასშტაბირება 1 კგ სიმინდის კაჭეჭის და სპირტის წარმოების ნარჩენის პოლიპროპილენის პარკებში ფერმენტაციისას, რამაც უზრუნველყო *B. amyloliquefaciens* B-1895-ის სპორების ყველაზე მაღალი გამოსავლიანობა 1 x 10^{12} სპორა/გ მშრალ ბიომასაზე.

დასკვნები: წარმოდგენილი კვლევის შედეგებმა შექმნა ახალი ფუნდამენტური ცოდნა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს და *B. subtilis* KATMIRA 1933-ს ფიზიოლოგიის შესახებ. წინამდებარე ფუნდამენტური კვლევის შედეგებმა უზრუნველყო შერჩეული ბაქტერიით სპორაწარმომქმნელი პრობიოტიკების წარმოების დაბალი ღირებულებისა და კონკურენტუნარიანი ტექნოლოგიების შემუშავება მცენარეული ნედლეულის სიღრმული და მყარფაზოვანი ფერმენტაციისას. ნაჩვენებია მიღებული პრობიოტიკული პრეპარატის მეფუტკრეობასა და მეფრინველეობაში გამოყენების პროფილაქტიკური, სამკურნალო და ეკონომიკური ეფექტი.

საძიებო სიტყვები: პრობიოტიკული ბაქტერიები, *Bacillus* spp, მცენარეული ნედლეულის ფერმენტაცია, სპორების წარმოება, კულტივირების პირობები.

Abstract

Introduction: Probiotics are therapeutic, prophylactic and growth-promoting food/animal feed supplements to increase animal productivity and improve human health. Developing competitive technology for producing spore-forming probiotic bacteria has become especially actual.

Objective: The main goal of the study was the elucidation of physiological mechanisms regulating the *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 and *Bacillus subtilis* KATMIRA 1933 growth and spore formation in the submerged and solid-state fermentation of plant raw materials and development of technogies of probiotic preparation production.

Methods: The submerged cultivation of bacilii was carried out using an Innova 44 shaker and 7 L fermenter. The solid-state fermentation of plant residues was carried out in flasks and polypropylene bags.

Results: It was established that the corn cobs and the ethanol production residue from the wheat grains were found to be the best substrates for the *B. amyloliquefaciens* B-1895 spore production (0.82 - 1.09 x 10^{10} spores/mL) while the mandarin peels ensured the highest yield of *B. subtilis* KATMIRA 1933 spores (5.7 x 10^{10} spores/mL). Experiments showed that depletion of the carbon source is the main stimulus for sporulation initiation by *B. subtilis* KATMIRA 1933 and *B. amyloliquefaciens* B-1895. The two-stage cultivation strategy was developed in a laboratory fermenter with the maximum spore yields 6.5 x 10^{10} spores/mL and 2.5 x 10^{10} spores/mL in the cultivation of *B. subtilis* KATMIRA 1933 and *B. amyloliquefaciens* B-1895, respectively.

It was established that the solid-state fermentation of plant raw materials is an appropriate method for the bacilli cultivation: the fermentation of corncobs and ethanol production residue provided 3.87-4.7 x 10^{11} spore/g biomass. The soaking of ethanol production residue by cheese or cottage cheese whey increased the *B. amyloliquefaciens* B-1895 spore yield by 7 and 37%, respectively, as compared with the control medium. The scaled up spore production was performed in the solid-state fermentation of 1 kg corn cobs and ethanol production residue by *B. amyloliquefaciens* B-1895 in the polypropylene bags with the spore yield 1 x 10^{12} spores/g biomass.

Conclusions: The present study provides new fundamental knowledge about *B. amyloliquefaciens* B-1895 and *B. subtilis* KATMIRA 1933 physiology. Fundamental research data provided the development of low cost and competitive technologies of probiotic production through the submerged and solid-state fermentations of plant raw materials by the selected bacteria. It was shown prophylactic, healing, and economic effect of probiotic usage in beekeeping and poultry.

Key words: probiotic bacteria, *Bacillus* spp, plant raw material fermentation, spore production, cultivation conditions.

ხელმძღვანელი: პროფ. ვლადიმერ ელისაშვილი /ხელმოწერა/_____

მადლობა

განსაკუთრებულ მადლობას ვუხდი ჩემს ხელმძღვანელს - ბიოლოგიურ მეცნიერებათა დოქტორს, პროფესორ ბატონ ვლადიმერ ელისაშვილს ჩემს მიმართ გამოჩენილი გულისხმიერებისა და თანადგომისთვის, ასევე სამეცნიერ-კვლევითი საქმიანობაში გაწეული ყოვლისმომცველი დახმარებისა და მხარდაჭერისთვის.

აქვე, მინდა მადლობა გადავუხადო საქართველოს აგრარული უნივერსიტეტის მცენარეული სუბსტრატების ბიოკონვერსიის ლაბორატორიის თანამშრომლებს, ქალბატონებს ევა ქაჩლიშვილს, ივეტა ბერიკაშვილს, თამარ ხარძიანს, ეკა მეტრეველს, აზა კობახიძეს, თინათინ ჯოხარიძეს, ბატონ მიხეილ ასათიანს.

მადლობას ვუხდი საქართველოს აგრარული უნივერსიტეტის რექტორატს და ადმინისტრაციას, განსაკუთრებით პროფესორებს: თეო ურუშაძეს, ანა ბოკუჩავას, ნატო კობახიძეს, ლევან გულუას, კახა დიდებულიძეს, გიორგი ზაალიშვილს, თეა ოშხერელს ოპონირებისა და სასარგებლო რეკომენდაციების მოწოდებისათვის.

მინდა მადლიერება გამოვხატო საქართველოს სოფლის მეურნეობის სამინისტროს ლაბორატორიის ხელმძღვანელის ბატონ ირაკლი გულედანისა და შპს „იმუნოგენი“-ს დირექტორის მოადგილის, სამუშაოს სამეცნიერო ხელმძღვანელის, პროფესორ მერაბ ნათიძის მიმართ ექსპერიმენტებისთვის საჭირო სტანდარტული კულტურალური შტამისა (*P. larvae*) და სხვა დამხმარე მასალების მოწოდებისათვის.

ასევე, მადლობას ვუხდი მეფუტკრეობის დარგის ექსპერტს ქალბატონ ნინო ყიფიანს და მეფუტკრე ფერმერს, ქალბატონ მარინა ქარდავას ცოცხალ ფუტკრებზე განხორციელებულ ექსპერიმენტისას გაწეული დახმარებისათვის.

სარჩევი

ვეტერინარიის სამეცნიერო მიმართულების კომისიის რეკომენდაცია..... i

ავტორის დეკლარაცია..... ii

რეზიუმე..... iii

ABSTRACT..... v

მადლობა..... vii

აბრევიატურა..... xiv

1. შესავალი……. 1

1.1. სადისერტაციო ნაშრომის მეცნიერული სიახლე……. 1

1.2. სადისერტაციო ნაშრომის პრაქტიკული მნიშვნელობა……... 2

1.3. სადისერტაციო ნაშრომის აპრობაცია……..... 2

1.4. სადისერტაციო ნაშრომის სტრუქტურა……. 3

2. ლიტერატურის მიმოხილვა…… 4

2.1. პრობიოტიკული მიკროორგანიზმები…… 7

2.2. *Bacillus* spp.-ს ზრდისა და სპორულაციის პროცესის ფიზიოლოგია…… 12

2.3. ნახშირბადის წყაროს გავლენა…….. 13

2.4. ზრდის ლიგნოცელულოზური სუბსტრატის გავლენა……... 18

2.5. აზოტის წყაროს გავლენა……..,. 19

2.6. საკვები არის pH-ის გავლენა……..... 20

2.7. მორევისა და აერაციის გავლენა……... 22

2.8. მიკროელემენტების გავლენა…… 24

2.9. კულტივირების მეთოდების გავლენა…… 26

2.10. *Bacillus* spp. პრობიოტიკის წარმოების მასშტაბირება ლაბორატორიულ ფერმენტიორში……..... 28

2.11. *Bacillus*-ის პრობიოტიკების გამოყენება……..... 33

2.12. პრობიოტიკების გამოყენება მეცხოველეობაში…… 37

2.13. პრობიოტიკების გამოყენება მეღორეობაში……..... 37

2.14. პრობიოტიკების გამოყენება მეფრინველეობაში…….. 40

2.15. პრობიოტიკების გამოყენება მეფუტკრეობაში……..... 44

3. მასალები და კვლევის მეთოდები…….. 48

3.1. პრობიოტიკული ბაქტერიები და ინოკულუმის მომზადება…….... 48

3.2. გამოყენებული მცენარეული ნედლეული…….... 48

3.3. სიღრმული კულტივირების პირობები…….... 48

3.4. მყარფაზოვანი ფერმენტაციის პირობები……..... 49

3.5. კულტივირება ფერმენტიორში……..... 50

3.6. პრობიოტიკების წარმოების მასშტაბირება მყარფაზოვანი ფერმენტაციის პირობებში…….. 51

3.7. სპორების დათვლა……..……... 51

3.8. ცელულაზისა და ქსილანაზის აქტივობის შეფასება……..... 52

3.9. *Bacillus subtilis* KATMIRA 1933 და *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895-ს ანტიბაქტერიული აქტივობის *in vitro* ტესტირება……..... 53

4. კვლევის შედეგები……... 55

4.1. *Bacillus subtilis* KATMIRA 1933-სა და *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895-ს პრობიოტიკების წარმოების ფიზიოლოგიური თავისებურების დადგენა სიღრმული ფერმენტაციის დროს……... 55

4.1.1. ნახშირბადის წყაროს გავლენა *Bacillus* spp.-ს სპორების პროდუცირებაზე……. 55

4.1.2. ლიგნოცელულოზური ზრდის სუბსტრატის გავლენა *Bacillus* spp.-ს სპორების პროდუცირებაზე……. 60

4.1.3. აზოტის წყაროს გავლენა *Bacillus* spp.-ს სპორების პროდუცირებაზე……. 66

4.1.4. *B. subtilis* KATMIRA 1933-სა და *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს კულტივირება ფერმენტიორში……. 71

4.2. *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895-ს პრობიოტიკების წარმოების ფიზიოლოგიური თავისებურების დადგენა ლიგნოცელულოზური ნედლეულის მყარფაზოვანი ფერმენტაციის დროს……..... 73

4.2.1. ლიგნოცელულოზური ზრდის სუბსტრატის გავლენა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს პრობიოტიკების წარმოებაზე მყარფაზოვანი ფერმენტაციის დროს…..... 74

4.2.2. აზოტის წყაროს გავლენა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს პრობიოტიკების წარმოებაზე მყარფაზოვანი ფერმენტაციის დროს……..... 76

4.2.3. შერჩეული მარილების გავლენა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს პრობიოტიკების წარმოებაზე მყარფაზოვანი ფერმენტაციის დროს……..... 79

4.2.4. კულტივირების ტემპერატურის გავლენა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს პრობიოტიკების წარმოებაზე მყარფაზოვანი ფერმენტაციის დროს…… 80

4.2.5. ყველის შრატისა და ხაჭოს შრატის გავლენა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს პრობიოტიკების წარმოებაზე, მყარფაზოვანი ფერმენტაციის დროს…… 81

4.2.6. პრობიოტიკების წარმოების მასშტაბირება მცენარეული ნედლეულის მყარფაზოვანი ფერმენტაცის დროს……..... 84

4.3. *Bacillus subtilis* KATMIRA 1933 და *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895-ს ანტიბაქტერიული აქტივობის *in vitro* ტესტირება და *Bacillus subtilis* KATMIRA 1933-ს სამკურნალო-პროფილაქტიკური ეფექტის ტესტირება ამერიკული სიდამპლით დაავადებულ ცოცხალ ფუტკრებზე……..……... 87

5. მიღებული შედეგების განხილვა…….. 93

6. დასკვნები…… 101

7. რეკომენდაცია……. 103

8. ბიბლიოგრაფია……... 104

ცხრილების სია

ცხრილი 1. პრობიოტიკების სპორაწარმოება batch და fed-batch ფერმენტაციის დროს……..... 32

ცხრილი 2. *Bacillus*-ის სპორების შემცველი კომერციული დანიშნულების პრობიოტიკული პრეპარატები……..... 35

ცხრილი 3. საკვები არის საბოლოო pH-ი და მარედუცირებელი შაქრების კონცენტრაცია *B. subtilis* KATMIRA 1933-ს სიღრმული ფერმენტაციის დროს საკვებ არეში ნახშირბადის სხვადასხვა წყაროს თანაობისას.....……..... 56

ცხრილი 4. ლიგნოცელულოზური ზრდის სუბსტრატის გავლენა *B. subtilis* KATMIRA 1933-ს სპორების პროდუცირებაზე……..…... 61

ცხრილი 5. მანდარინის ქერქის კონცენტრაციის გავლენა *B. subtilis* KATMIRA 1933-ს სპორების პროდუცირებაზე……..…... 62

ცხრილი 6. ლიგნოცელულოზური ზრდის სუბსტრატის გავლენა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს სპორების პროდუცირებაზე…….. 63

ცხრილი 7. ხორბლის სპირტის წარმოების ნარჩენების კონცენტრაციის გავლენა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს სპორების პროდუცირებაზე……..... 64

ცხრილი 8. სიმინდის კაჭეჭის კონცენტრაციის გავლენა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს სპორების პროდუცირებაზე……..…... 65

ცხრილი 9. აზოტის წყაროების გავლენა *B. subtilis* KATMIRA 1933-ს სპორების პროდუცირებაზე…….…... 66

ცხრილი 10. აზოტის წყაროს კონცენტრაციის გავლენა *B. subtilis* KATMIRA 1933-ს სპორების პროდუცირებაზე……..…... 67

ცხრილი 11. აზოტის წყაროების გავლენა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს სპორების პროდუცირებაზე……..... 69

ცხრილი 12. კაზეინის ჰიდროლიზატის კონცენტრაციის გავლენა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს სპორების პროდუცირებაზე……..…... 70

ცხრილი 13. მცენარეული ზრდის სუბსტრატის გავლენა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს სპორაწარმოქმნაზე და ფერმენტულ აქტივობაზე…….…... 75

ცხრილი 14. სუბსტრატის რაოდენობისა და ფენის სიმაღლის გავლენა სპორების დაგროვებაზე *B. amyloliquefaciens* B-1895-ით სიმინდის კაჭეჭის მყარფაზოვანი ფერმენტაციის პირობებში……..... 76

ცხრილი 15. აზოტის წყაროს გავლენა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს სპორების დაგროვებაზე სიმინდის კაჭეჭის მყარფაზოვანი ფერმენტაციის დროს…….. 77

ცხრილი 16. კულტივირების ტემპერატურის გავლენა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს ზრდის პროცესზე და სპორების დაგროვებაზე სიმინდის კაჭეჭის მყარფაზოვანი ფერმენტაციის დროს……..... 81

ცხრილი 17. ყველის შრატისა და ხაჭოს შრატის გავლენა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს სპორების დაგროვებაზე სიმინდის კაჭეჭის მყარფაზოვანი ფერმენტაციის დროს……..... 82

ცხრილი 18. ყველის შრატისა და ხაჭოს შრატის გავლენა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს სპორების დაგროვებაზე სპირტის წარმოების ნარჩენების მყარფაზოვანი ფერმენტაციის დროს…….....……..... 83

ცხრილი 19. ბაზიდიალური სოკოების *Lentinus edodes* 2175 და *L. edodes* 2191 მიერ ფერმენტირებულ სუბსტრატებზე *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს პრობიოტიკული შტამის სპორების დაგროვება…….. 86

ფიგურების სია

ფიგურა 1. ნახშირბადის წყაროების გავლენა *B. subtilis* KATMIRA 1933-ს სპორების გამოსავლიანობაზე…….…..... 55

ფიგურა 2. გლუკოზის კონცენტრაციის გავლენა *B. subtilis* KATMIRA 1933-ს სპორების გამოსავლიანობაზე……..... 57

ფიგურა 3. ნახშირბადის წყაროების გავლენა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს სპორების გამოსავლიანობაზე კულტივირების 48 და 72 საათის შემდეგ.....…. 58

ფიგურა 4. გლუკოზის კონცენტრაციის გავლენა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს სპორების გამოსავლიანობაზე…….……..... 59

ფიგურა 5. ვეგეტატური უჯრედებისა და სპორების რაოდენობის, ცელულაზისა და ქსილანაზის აქტივობის კინეტიკა *B. subtilis* KATMIRA 1933-ს ფერმენტიორში კულტივირების დროს……..... 72

ფიგურა 6. ვეგეტატური უჯრედებისა და სპორების რაოდენობის კინეტიკა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ის ფერმენტიორში კულტივირების დროს……..... 72

ფიგურა 7. აზოტის წყაროს კონცენტრაციის გავლენა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს სპორების დაგროვებაზე სიმინდის კაჭეჭის მყარფაზოვანი ფერმენტაციის დროს…. 78

ფიგურა 8. მარილების გავლენა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს სპორების დაგროვებაზე სიმინდის კაჭეჭის მყარფაზოვანი ფერმენტაციის დროს……..... 79

ფიგურა 9. მკვდარი ფუტკრების რაოდენობა დაინფიცირებამდე……..... 89

ფიგურა 10. მკვდარი ფუტკრების რაოდენობა დაინფიცირების შემდეგ, ექსპერიმენტის ბოლოს…….....……..... 90

სურათების სია

სურათი 1. *B. subtilis* KATMIRA 1933-სა და *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს პრობიოტიკული პრეპარატების წარმოების მასშტაბირება თერმოსტატში……..... 84

სურათი 2. *B. subtilis* KATMIRA 1933-სა და *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს პრობიოტიკული პრეპარატების წარმოების მასშტაბირება კლიმატოკამერაში…….. 85

სურათი 3. *B. subtilis* KATMIRA 1933-სა და *B. amyloliquefaciens* B-1895 - ს სპორების განუზავებელი, 10^{-1}, 10^{-2} კონცენტრაციებით ანტიბაქტერიული აქტივობა *P. larvae*-ს მიმართ *in vitro* პირობებში (ინჰიბირება გამოსახულია გაუფერულებული ზონებით)..... 87

სურათი 4. *B. subtilis* KATMIRA 1933-სა და *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს ნაზრდი ინჰიბირების ზონებში…… ……..…….....……..... 88

სურათი 5. ფუტკრების ამერიკული სიდამპლით დაინფიცირების ტესტირება……. 89

სურათი 6. *B. subtilis* KATMIRA 1933-ს პრობიოტიკული პრეპარატით ფუტკრის ამერიკული სიდამპლით დაავადებული ფუტკრების დამუშავება…….....……..... 91

სურათი 7. *B. subtilis* KATMIRA 1933-ს პრობიოტიკული პრეპარატით ფუტკრის ამერიკული სიდამპლის მიმართ განხორციელებული სამკურნალო-პროფილაქტიკური ღონისძიების ეფექტიანობის ლაბორატორიული ტესტირება…….....…..... 92

აბრევიატურა

- **კწე** -კოლონიაწარმომქმნელი ერთეული
- **AFB -** ფუტკრის ამერიკული სიდამპლე
- **CMC**აზა -კარბოქსილმეთილცელულაზა
- **DO** - გახსნილი ჟანგბადის კონცენტრაცია
- **DPA**- დიფიკოლინის მჟავა
- **DSM** - Difco-ს სპორულაციის საკვები არე
- **FAO** (Food and Agriculture Organization) - სურსათისა და სოფლის მეურნეობის ორგანიზაცია
- **HCDC** - მაღალი უჯრედული სიმჭიდროვით კულტივირება
- **LF** - სიღმული ფერმენტაცია
- **Log** - ლოგარითმი
- **Mushroom spent substrate** (mushroom SS) - სოკოს წარმოების ნარჩენი
- **NC** - ნეგატიური კონტროლი
- **PC** - პოზიტიური კონტროლი
- **RS** - მარედუცირებელი შაქრები
- **SD -** სტანდარტული გადახრა
- **SSF**- მყარფაზოვანი ფერმენტაცია
- **WHO** (World Helth Organization)- ჯანდაცვის მსოფლიო ორგანიზაცია

1. შესავალი

Bacillus-ი გრამდადებით ბაქტერიებს შორის ბაქტერიების გვარის ერთ-ერთი ყველაზე კარგად შესწავლილი და დახასიათებული წარმომადგენელია. ამ ბაქტერიის მიმართ ინტერესი გამოწვეულია მის მიერ ენდოსპორის ფორმირებისა და აგრონომიული, ფარმაცევტული და სამრეწველო გამოყენებისთვის ფასეული მეტაბოლიტების წარმოების უნარით.

წინამდებარე სადოქტორო დისერტაცია ეხება *B. subtilis*-სა და *B. amyloliquefaciens* -ს ზრდისა და სპორების პროდუცირების განმსაზღვრელი ფიზიოლოგიური თავისებურებებისა და მექანიზმების შესახებ ახალი, ფუნდამენტური ცოდნის შეგროვებას. განხორციელებული კვლევები ფოკუსირებულია სხვადასხვა ლიგნოცელულოზური ნედლეულის სიღრმული და მყარფაზოვანი ფერმენტაციის პირობებში სპორაწარმომქმნელი პრობიოტიკების იაფი და კონკურენტუნარიანი საწარმოო ტექნოლოგიის შემუშავებასა და მიღებული პრეპარატის მეცხოველეობაში, კერძოდ მეფუტკრეობაში სამკურნალო-პროფილაქტიკური მიზნით გამოყენებაზე.

1.1. სადისერტაციო ნაშრომის მეცნიერული სიახლე

წინამდებარე კვლევის საფუძველზე შექმნილია ფუნდამენტური შედეგების ინტეგრირებული მონაცემთა ბაზა პრობიოტიკული სპორაწარმომქმნელი ბაქტერიების *B. amyloliquefaciens* B-1895 და *B. subtilis* KATMIRA 1933-ს ზრდისა და სპორულაციის ფიზიოლოგიის შესახებ, მცენარეული ნედლეულის სიღრმული და მყარფაზოვანი ფერმენტაციის პირობებში. კერძოდ, გამოვლენილია ინდივიდუალური მცენარეული სუბსტრატების, ნახშირბადის წყაროს, ყველისა და ხაჭოს შრატის და მათი კონცენტრაციების მარეგულირებელი როლი სპორებისა და ფერმენტების წარმოქმნის პროცესში. პირველად ჩატარდა შედარებითი კვლევა და შეფასდა *B. amyloliquefaciens* B-1895 და *B. subtilis* KATMIRA 1933-ს მცენარეული ნედლეულის სიღრმული და მყარფაზოვანი ფერმენტაციისას სპორაწარმოების პოტენციალი. აგრეთვე დადგინდა, რომ *B. subtilis* KATMIRA 1933 და *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს აქვს უნარი გამოიყენოს ზრდისთვის და სპორების წარმოებისათვის სხვადასხვა ლიგნოცელულოზური ნედლეული, როგორც ზრდის

სუბსტრატი. ორივე ბაქტერიის ცელულაზური და ქსილანაზური აქტივობა სრულად უზრუნველყოფს *B. amyloliquefaciens* B-1895 და *B. subtilis* KATMIRA 1933-ს ზრდის მცენარეული სუბსტრატის პოლისაქარიდების ჰიდროლიზს მეტაბოლიზირებად შაქრებამდე. აღმოჩენილი და დახასიათებულია მიღებული სპორაწარმომქმნელი პრობიოტიკული პრეპარატის ანტიბაქტერიული მოქმედება.

1.2. სადისერტაციო ნაშრომის პრაქტიკული მნიშვნელობა

დაგროვილი ფუნდამენტური შედეგები გამოყენებული იქნა როგორც პლატფორმა სპორაწარმომქმნელი პრობიოტიკების წარმოების იაფი და კონკურენტუნარიანი ბიოტექნოლოგიების შემუშავებისთვის. აღნიშნული ტექნოლოგიის მასშტაბირება მსოფლიოში უმაღლესი გამოსავლიანობით, განხორციელდა ლაბორატორიულ ფერმენტიორში და პოლიპროპილენის პარკებში, კლიმატოკამერაში, სიღრმული და მყარფაზოვანი ფერმენტაციის პირობებში, შესაბამისად. აღნიშნული კვლევა უზრუნველყოფს ადგილობრივი სოფლის მეურნეობისა (ლიგნოცელულოზური) და რძის წარმოების (შრატი) ნარჩენების გადამუშავებას, რაც დამატებითი ღირებულების მქონე პროდუქტების მიღების გზით დადებით გავლენას მოახდენს საქართველოს ეკონომიკასა და ეკოლოგიაზე. პირველად, ტესტირებულ იქნა და გამოვლინდა მიღებული სპორაწარმომქმნელი პრობიოტიკული პრეპარატის სამკურნალო-პროფილაქტიკური ეფექტი ფუტკრის ამერიკული სიდამპლის გამომწვევის *P. larvae*-ს მიმართ, როგორც *in vitro* პირობებში, ასევე ცოცხალ ფუტკრებში. ტესტირების შედეგები ცხადყოფს *B. amyloliquefaciens* B-1895 და *B. subtilis* KATMIRA 1933-ს პრობიოტიკული პრეპარატების ფართო სპექტრით გამოყენების პერსპექტივას მეცხოველების სხვადასხვა დარგში, ცხოველების ჯანმრთელობისა და პროდუქტიულობის გაუმჯობესების მიზნით.

1.3. სადისერტაციო ნაშრომის აპრობაცია

დისერტაციასთან დაკავშირებული საკითხები წარდგენილი იყო 1 საერთაშორისო კონფერენციაზე. დისერტაციის ძირითადი შედეგები ასახულია 3 საერთაშორისო მაღალრეიტინგულ ჟურნალში. 2014-2017 წლებში კვლევის შედეგების წარდგენა ხდებოდა პერიოდულად, დოქტორანტის სემინარებზე და ლაბორატორიის

პრეზენტაციებზე. სადისერტაციო ნაშრომი ნაწილობრივ შესრულდა შოთა რუსთაველის ეროვნული სამეცნიერო ფონდის მიერ დაფინანსებული პროექტის „სპორაწარმომქმნელი პრობიოტიკების წარმოების ტექნოლოგიის შემუშავება და გამოყენება მეფუტკრეობაში“ ფარგლებში (PhDF2016_178).

1.4. სადისერტაციო ნაშრომის სტრუქტურა

სადისერტაციო ნაშრომი მოიცავს კომპიუტერზე ნაბეჭდ 114 გვერდს. იგი შედგება შესავლის, 5 თავის, დასკვნებისა და რეკომენდაციისგან. ტექსტი მოიცავს 19 ცხრილს, 10 ფიგურასა და 7 სურათს, ნაშრომს ერთვის გამოყენებული ლიტერატურის სია (112 ერთეული).

2. ლიტერატურის მიმოხილვა

პრობიოტიკებმა დღეს უკვე შეიძინეს მაღალი სამეცნიერო და კომერციული ინტერესი. ცხოველთა სხვადასხვა დაავადების პროფილაქტიკისა და მათი ზრდის დაჩქარების მიზნით, ცხოველის საკვებში ანტიბიოტიკების ინგრედიენტად ფართო გამოყენება გახდა მომხმარებელთა მხრიდან ცხოველური წარმოშობის ორგანული და ჯანსაღი სასურსათო პროდუქტების მიმართ გაზრდილი მოთხოვნილების მიზეზი. აღსანიშნავია, რომ ანტიბიოტიკების გამოყენებასთან დაკავშირებულმა პრაქტიკამ გამოიწვია პათოგენების ანტიბიოტიკორეზისტენტული შტამების გამრავლება-განვითარება, ზოგიერთ შემთხვევაში წარუმატებელი ანტიბიოტიკოთერაპია, ორგანიზმის იმუნური ფუნქციის დაქვეითება, პროდუქტიულობის შემცირება ცხოველებში და ზოონოზური ინფექციების რისკი, რადგან ანტიბიოტიკების ნარჩენი ნივთიერებები კუმულირდებიან რა ცხოველური წარმოშობის სურსათში, ამ სურსათის მოხმარების შემდეგ რეზისტენტული გენი ცხოველიდან გადადის ადამიანის მიკრობიოტაში (Mathur, Singh, 2005). გილჩრისტი და სხვები (Gilchrist et al. 2007) აღნიშნავენ, რომ 1989-1990 წლებში გამოყოფილ იქნა ციპროფლოქსაცინის მიმართ კამპილობაქტერიის არარეზისტენტული შტამები, მაშინ როდესაც 2001 წელს ადამიანებიდან გამოყოფილი ამავე ბაქტერიის იზოლატები რეზისტენტულები აღმოჩნდნენ იგივე ანტიბიოტიკის მიმართ. შესაბამისად, ზრდის დამაჩქარებლად ანტიბიოტიკების გამოყენება ევროკავშირში აკრძალულია.

უნდა აღინიშნოს, რომ ანტიბიოტიკებზე უარის თქმას მოჰყვა სხვადასხვა სახის ნეგატიური შედეგი, კერძოდ, ქვეყნებში, სადაც აიკრძალა ანტიბიოტიკების გამოყენება, ღორებსა და ფრინველებში გაიზარდა ცხოველთა დაავადებები და დაცემა, ხოლო ცხოველთა პროდუქტიულობა შემცირდა (Flint, Garner, 2009). აღნიშნულიდან გამომდინარე, გაჩნდა გადაუდებელი აუცილებლობა ალტერნატიული საშუალების და სტრატეგიის მოძიებისა, რაც შესაძლებელს გახდიდა ანტიბიოტიკების მსგავსად, პათოგენების ეფექტიან კონტროლს და საჭმლის მომნელებელი სისტემის მიკრობიოტის მოდულირებას, რაც გადამწყვეტ როლს თამაშობს მასპინძელი ორგანიზმის ჯანმრთელობაზე (Tuohy et al., 2005). მრავალი გამოქვეყნებული პუბლიკაცია ადასტურებს, რომ პრობიოტიკული პრეპარატების ანუ

მიკროორგანიზმების კულტურების გამოყენება, რომელთაც შეუძლიათ წარმოქმნან ბუნებრივი დამცავი ბარიერი ცხოველსა და ინფექციური დაავადების გამომწვევს შორის, გახდნენ ყველაზე რეალური ალტერნატივები ტრადიციული ანტიბიოტიკოთერაპიის ნაცვლად (Krehbiel et al., 2003; Brashears et al., 2005; Soccol et al., 2010; Giacchi et al., 2016).

ტერმინი პრობიოტიკი ბერძნული წარმოშობისაა და „pro bios“ ქართულად ნიშნავს „სიცოცხლისათვის“. მიუხედავად იმისა, რომ ამ განმარტებამ განიცადა მრავალი ცვლილება, ყველაზე ფართოდ გავრცელებულია ჯანმრთელობის დაცვის მსოფლიო ორგანიზაციის მიერ განმარტებული ტერმინი „პრობიოტიკები“, როგორც „ცოცხალი მიკროორგანიზმები, რომელთა ადეკვატური რაოდენობით გამოყენება მასპინძელ ორგანიზმს ანიჭებს ჯანმრთელობის სარგებელს“ (FAO, WHO, 2002). გარდა ამისა, სურსათში გამოყენებული პრობიოტიკული მიკროორგანიზმები უნდა იყვნენ უსაფრთხო და ეფექტიანი, უნდა ჰქონდეთ უნარი შეინარჩუნონ სიცოცხლისუნარიანობა საჭმლის მომნელებელ სისტემაში გადაადგილებისას, ადვილად გამრავლდნენ და წარმოქმნან კოლონიები საჭმლის მომნელებელ ტრაქტში. პრობიოტიკები მასპინძელ ორგანიზმზე ახდენენ მრავალმხრივ სასარგებლო ზეგავლენას, კერძოდ, არეგულირებენ საჭმლის მომნელებელი სისტემის მიკროფლორის ჰომეოსტაზს, ასტაბილურებენ გასტროინტესტინალური ბარიერის ფუნქციონირებას, ბაქტერიოცინების ექსპრესიას, მათი ფერმენტული აქტივობა აუმჯობესებს აბსორბციას და კვებას, აქვთ იმუნომოდულატორული ეფექტი, თრგუნავენ პროკარცენოგენურ ფერმენტებს და ხელს უშლიან პათოგენებს ლორწოვან გარსებზე კოლონიების წარმოქმნასა და ინფიცირებაში (Gaggìa et al., 2010; Cutting, 2011; Elshaghabee et al., 2017).

პრობიოტიკები წარმოადგენენ საკმაოდ გავრცელებულ თერაპიულ, პროფილაქტიკურ და ზრდის გასაუმჯობესებელ სასურსათო/ცხოველის საკვების დანამატს, ცხოველთა პროდუქტიულობის ზრდისა და ადამიანის ჯანმრთელობისათვის. პრობიოტიკული ბაქტერიის შემცველი სურსათი განეკუთვნება ფუნქციონალური სურსათის კატეგორიას, რომლის შესახებ განაცხადი პირდაპირ მიუთითებს ამ სურსათის ადამიანის ჯანმრთელობაზე პოზიტიურ გავლენაზე. სასურსათო პრობიოტიკებთან დაკავშირებით შეიძლება ითქვას, რომ ბაზარზე მრავლადაა სხვადასხვა ჯანმრთელი სასურსათო პროდუქტი და

ფარმაცევტული დანიშნულების პრეპარატი, რომლებიც შეიცავენ პრობიოტიკებს. ბაზრის კვლევის შედეგების გათვალისწინებით 2014 წელს პრობიოტიკების მსოფლიო ბაზარი შეფასებულ იქნა 62.6 მილიარდი დოლარით და როგორც მოსალოდნელია, 2020 წლისთვის იგი მიაღწევს 96.0 მილიარდ დოლარს. ტრადიციულად, *Lactobacillus*-ს და *Bifidobacterium*-ს შტამები გამოიყენება როგორც პრობიოტიკული პროდუქტები. ამასთანავე, შესწავლილი და კომერციალიზებული იქნა მეცხოველეობაში, განსაკუთრებით მეფრინველეობაში *Bacillus*-ის გვარის და მასთან დაკავშირებული სხვა სპორაწარმომქმნელი ბაქტერიები (Aureli et al., 2011; Mol nár et al., 2011; Lee et al., 2014). პრობიოტიკების სპორები, აგრეთვე იწარმოება და ექსტენსიურად გამოიყენება ადამიანებში, როგორც დიეტური დანამატი (მაგალითად: Bactisubtil®, საფრანგეთი; Nature's First Food, აშშ), ასევე, გამოიყენება როგორც სხვადსხვა სახის პროდუქტიული ცხოველების ზრდის დამაჩქარებელი და პათოგენური მიკროფლორის კონკურენტი და შემზღუდავი აგენტი (მაგალითად: BioGrow®, დიდი ბრიტანეთი; Toyocerin®, იაპონია) და აკვაკულტურებში, ზრდის დამაჩქარებლად და დაავადებების საწინააღმდეგოდ (მაგალითად: Biostart®, აშშ; Promarine®, ბელგია). თუმცა, ლიტერატურული მონაცემების ანალიზმა აჩვენა, რომ დღეისათვის *Bacillus* spp-ს შტამების მცირე რაოდენობაა ექსტენსიურად შეწავლილი და მათი მასიური წარმოება წარმოადგენს ბიოკონტროლირებადი პროდუქტების კომერციული განვითარების ერთ-ერთ მნიშვნელოვან ასპექტს. ცოტა რამაა ცნობილი ბაცილის ზრდის ფიზიოლოგიური თავისებურებებისა და ლიგნოცელულოზური ფერმენტაციის დროს სპორაწარმოების შესახებ, განსაკუთრებით მყარფაზოვანი ფერმენტაციის პირობებში. გარდა ამისა, მწირია ინფორმაცია ბაცილის ლიგნოცელულოზური ფერმენტაციის დროს ჰიდროლიტური ფერმენტების წარმოებაზე, თუმცა, პოლისაქარიდები, როგორც წესი, წარმოადგენენ ბაქტერიული ზრდის ძირითად წყაროს და ცელულაზები ხშირად ასრულებენ გადამწყვეტ როლს ბაქტერიებისთვის ნახშირბადისა და ენერგიის რესურსის სტაბილურ მიწოდებაში. ამიტომ, საჭირო ხდება სპორაწარმომქმნელი პრობიოტიკების წარმოების იაფი ღირებულებისა და მაღალეფექტიანი ტექნოლოგიების განვითარება ბაცილის ფიზიოლოგიის და სპორულაციის ეფექტიანობის შესახებ ახალი და ღრმადფუნდამენტური ცოდნის მიღების მეშვეობით, რაც ასევე გულისხმობს

საქართველოში ადვილად ხელმისაწვდომი, განახლებადი და იაფი აგროსასურსათო, ინდუსტრიული, ლიგნოცელულოზური ბიომასის ფერმენტაციას.

2.1. პრობიოტიკული მიკროორგანიზმები

საყოველთაოდ აღიარებულია, რომ კარგ პრობიოტიკულ მიკროორგანიზმებს მასპინძელ ორგანიზმზე სასარგებლო ზეგავლენის მოხდენის გარდა უნდა ჰქონდეთ შემდეგი აუცილებელი ფუნქციონალური და ტექნოლოგიური თვისებები, კერძოდ: პირველი, ისინი უნდა იყვნენ უსაფრთხო ადამიანის მოხმარებისათვის, არ უნდა გააჩნდეთ პათოგენური ან ტოქსიური ეფექტი; მეორე, უკეთესი იქნება, თუ ისინი წარმოშობილი იქნებიან ჯანმრთელი ადამიანის ინტესტინალური ტრაქტიდან, რადგან ასეთი მიკროორგანიზმები უსაფრთხოა ადამიანისთვის და საჭმლის მომნელებელ ტრაქტში უკეთ ადაპტირებენ; მესამე, ისინი უნდა იყვნენ გამძლე კუჭის წვენისა და ნაღვლის მჟავების, ასევე, უნდა იყვნენ საკმარისად რეზისტენტულები საჭმლის მომნელებელი ფერმენტების მიმართ, რათა გადარჩნენ ინტესტინალურ ტრაქტში გავლისას; მეოთხე, უნდა იძლეოდნენ იმ პარამეტრების დეტექტირების საშუალებას, რომლებიც ადასტურებენ ნაწლავური ფლორის სიცოცხლისუნარიანობაზე მათ დადებით ზეგავლენას, ნაწლავების ეპითელურ უჯრედებზე ადჰეზიისა და ადამიანის ნაწლავებში რეპროდუქციის უნარს; და ბოლოს, მათ უნდა შეძლონ ინდუსტრიული მასშტაბებით წარმოებისას მაღალი გამოსავლიანობა და ასევე, უნდა იყვნენ სტაბილურები და სიცოცხლისუნარიანები საწარმოო პროცესისა და შენახვის დროს (Fuller, 1989; Lam and Cheung, 2013; Giacchi et al., 2016). პრობიოტიკები, როგორც ვარაუდობენ, აუმჯობესებენ ნაწლავების მიკროფლორას კუჭნაწლავის ტრაქტის პათოგენური ბაქტერიების კოლონიზაციის შეზღუდვის გზით (Hoa et al., 2000). არსებობს ოთხი ძირითადი გზა, რომელთა საშუალებით შესაძლებელია მიღწეულ იქნეს ზემოაღნიშნული, კერძოდ, ესენია: იმუნური სისტემით პათოგენური ბაქტერიების გამორიცხვა; კონკურენტული ადჰეზიით პათოგენების გამორიცხვა; ანტიმიკრობული ნაერთების სინთეზი, რომელიც ხელს უშლის კუჭნაწლავის ტრაქტის პათოგენების კოლონიზაციას; პათოგენებისთვის აუცილებელ საკვებზე კონკურენცია (Cartman and La Ragione, 2004;

Senesi, 2004). ზოგადად ითვლება, რომ კარგი პრობიოტიკული მიკროორგანიზმები უნდა იყვნენ ადამიანის ნაწლავების მიკრობიოტის ნორმალური ინჰაბიტანტები. თუმცა აღსანიშნავია, რომ ნაწლავური წარმოშობის შტამები ჩვეულებისამებრ, მგრძნობიარე არიან ჟანგბადის მიმართ და საჭიროებენ სპეციფიურ, ხშირად მდიდარ საკვებ არეს და მათი კულტივირება ინდუსტრიული მასშტაბებით სავარაუდოდ, რთულია.

პრობიოტიკების უმრავლესობა წარმოადგენენ *Lactobacillus*-ის და *Bifidobacterium*-ის გვარის სხვადასხვა სახეობას, რომლებსაც შეუძლიათ ნახშირწყლების ფერმენტაცია რძის მჟავად, თრგუნავენ რა პათოგენური ბაქტერიების ზრდას. ეს ბაქტერიები ჩვეულებისამებრ, ბინადრობენ ჯანმრთელ ნაწლავურ ფლორაში, ასევე ისინი შესაძლებელია ნაპოვნი იქნეს პირის ღრუსა და საშოში. პრობიოტიკულ დანამატებში აღმოჩენილი ლაქტობაცილები ასევე მოცავენ: *L. acidophilus, L.bulgaricus, L.casei, L.plantarum, L.salivarius* და ბევრი სხვა. პრობიოტიკებად გამოყენებულ *Bifidobacteria*-ებს შორისაა აგრეთვე *B.bifidum, B.breve, B.lactis, B.thermophilum* და სხვ. *Enterococcus, Streptococcus, Saccharomyces* და *Aspergillus*-ს რამდენიმე შტამი ასევე ხელმისაწვდომია, როგორც ერთი სახეობა ან კომბინაცია რამოდენიმე სახეობასთან (Fuller, 1989; Soccol et al., 2010).

სპორაწარმომქმნელი აერობული ბაქტერიები, განსაკუთრებით *Bacillus* spp-ს ზოგიერთი სახეობა უფრო და უფრო მეტად იქცევენ მზარდ ყურადღებას მათი ინდუსტრიული პოტენციალის გამო პრობიოტიკების, ბიოპესტიციდებისა და ბიოსასუქის საწარმოებლად. *Bacillus*-ის საფუძველზე დამზადებული პროდუქტები კომერციულად ხელმისწვდომი, ბაქტერიული, ბიოლოგიურად კონტროლირებადი აგენტების დაახლოებით 85 %-ს შეადგენენ, მაგრამ ასეთი ბიოპროდუქტების კომერციალიზაცია შესაძლებელია სპორების ინდუსტრიული წარმოების შემთხვევაში, რაც საჭიროებს უჯრედების მაღალი კონცენტრაციის ბიორაექციებს და მაღალეფექტიან სპორულაციას. სწორედ ამიტომ, სპორების წარმოება წარმოადგენს ძირითად ეტაპს ბიოპროდუქტების ბაზრის განვითარებისთვის, როდესაც სპორაწარმომქმნელი აერობული ბაქტერია აქტიური ინგრედიენტია.

კატინგის თანახმად (Cutting 2011), *Bacillus*-ის სახეობების დიეტურ დანამატად გამოყენება სწრაფად ხდება ფართოდ მოთხოვნადი. *Bacillus*-ის გვარი მოიცავს 77

სახეობის აღიარებულ, გრამ-დადებით, სპორაწარმომქმნელ, აერობულ ან ფაკულტატურ ანაერობულ, ჩხირისებრ, კატალაზა-დადებით ბაქტერიას. „List of prokaryotic names with standing in nomenclature" - ს (http://www.bacterio.net/bacillus.html) თანახმად, ამ გვარის გამოყოფილი სახეობების რაოდენობამ უკვე 318 მიაღწია. დადასტურებულია B. *subtilis*-ის და *B. cereus*-ის ზრდა ანაერობულ, *in vivo*-ნაწლავურ გარემოში, სხვადასხვა პირობებში, რაც მნიშვნელოვანი აღმოჩენაა (Sanders et al., 2003). ამ ბაქტერიების სპორულაცია ინიცირდება სტრესული პირობების საპასუხოდ, მაგალითად საკვების ამოწურვის დროს (Setlow, Johnson, 2007).

სპორები წარმოადგენენ მეტაბოლურად ინაქტივირებული უჯრედების დიფერენცირებულ ტიპს, რომლებსაც აქვთ უნარი წინააღმდეგობა გაუწიონ ქიმიურ და ფიზიკურ სტრესს, მათ შორის გამოშრობას, მაღალ ტემპერატურას, მაღალ წნევას, ულტრაიისფერ გამოსხივებას და მჟავა გარემოს. სპორების გარემო პირობებისადმი მაღალი გამძლეობა აიხსნება რამდენიმე სპეციფიური ფენისა და სპორის ძალზედ დეჰიდრირებული ბირთვის არსებობით. *Bacillus* spp.-ს სპორულაციის პროცესი იწყება ექსპონენციური ფაზის ბოლოს, სტაციონარული ზრდის ფაზის პერიოდში, როდესაც უჯრედების სიმჭიდროვე აღწევს დაახლოებით 10^8 უჯრედს/მლ-ში, ამოწურულია ნუტრიენტები და მაღალი ტემპერატურისადმი რეზისტენტული სპორების წარმოქმნა სრულდება დაახლოებით 8 საათში. თუმცა, აღსანიშნავია, რომ ბაცილის სპორულაცია შესაძლებელია გამოწვეული იყოს არა მხოლოდ საკვები ნივთიერებების ამოწურვით, არამედ სხვა გარემო პირობების ზემოქმედებით, მათ შორის pH-სა და ტემპერატურის ცვლილების ჩათვლით (Turnbull et al., 1990). საუკეთესო პირობებში *B. subtilis*-ის უჯრედების სიმჭიდროვე და სპორულაციის ეფექტიანობა აღწევს 1 x 10^8 – 1.52 x 10^{10} კწე/მლ-ში და 30-80%-ს, შესაბამისად, სერიული განზავებისა და თასზე დათვლის მეთოდის გამოყენებით (Hageman et al., 1984; Sonenshein, 2000; Monteiro et al., 2005; Cutting, 2011; Tavares et al., 2013).

ბაცილები ბუნებაში ფართოდაა გავრცელებული, ისინი ასოცირდებიან ნიადაგთან, წყალთან, მტვერთან, ჰაერთან, ისევე როგორც ბოსტნეულთან და ფერმენტირებულ პროდუქტებთან - Natto (Japan), Gari (Africa), Douchi (China) და სხვები (Elshaghabee et al., 2017). გარდა ამისა, მათი პოვნა შესაძლებელია ადამიანისა და ცხოველების ნაწლავების ნორმალურ მიკროფლორაში და შეუძლიათ ჩაიზარდონ

და რესპორულაცია განიცადონ გასტროინტესტინალურ ტრაქტში (Cutting, 2011). *Bacillus* spp. ხასიათდება გარემო პირობებისადმი ადაპტაციისა და ბიონედლეულში ზრდის კარგი უნარით, ანუ შესაძლებელია ისინი ჩართული იქნენ ყოველდღიური მოხმარების სურსათში. დაშვებულია თერმოსტაბილური სპორების ხანგრძლივი ვადით შენახვა გაყინვისა და კაფსულირების გარეშე. გარდა ამისა, სპორებს შეუძლიათ სიცოცხლისუნარიანობის შენარჩუნება კუჭში, დაბალი pH-ის პირობებში (Barbosa et al., 2005) და *Lactobacillus* spp.-სგან განსხვავებით, პერორალურად მიღებული ბაქტერიების სრული დოზა აღწევს წვრილ ნაწლავამდე (Tuohy et al., 2007). უფრო მეტიც, ბაცილის ანტიმიკრობული სეკრეციით განპირობებულმა (კოაგულინი, ამიკოუმაცინი, სუბტილისინი) მაღალმა ანტაგონისტურმა აქტივობამ ასევე, შესაძლოა გამოიწვიოს პრობიოტიკული ეფექტი, შეაჩეროს ნაწლავური ბაქტერიების, როგორც კუნკურენტი მიკრობების ზრდა. და ბოლოს, კარგადაა შესწავლილი *Bacillus* spp.-ს ვეგეტატური ფორმების (განსაკუთრებით, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* და *B. licheniformis*) შესაძლებლობა აწარმოოს უჯრედგარე ამილაზა, გლუკოამილაზა, პროტეაზა, ცელულაზა, ქსილანაზა, პექტაზა და ლიპაზა მაღალი გამოსავლიანობით (25 გ-მდე 1 ლიტრზე), რასაც შეუძლია გააუმჯობესოს როგორც ნუტრიენტების გადამუშავება და შეწოვა, ასევე ნაწლავების იმუნური ფუნქცია (Samanya and Yamauchi, 2002; Chen et al., 2009; Ghani et al., 2013; van Dijl, Hecker, 2013; Prajapati et al., 2015; Elshaghabee et al., 2017; Siu-Rodas et al., 2018). *Bacillus*-ის სხვადასხვა სახეობები დამატებით, ასევე გამოიყენება ადამიანის მოხმარებისთვის განკუთვნილი სასურსათო დანამატების, მათ შორის ვიტამინებისა (რიბოფლავინის, კობალამინის, ინოსიტოლის) და კაროტინოიდების საწარმოებლად (Tanaka et al., 2014; Elshaghabee et al., 2017).

Bacillus-ის სახეობებიდან ყველაზე ექსტენსიურად შესწავლი არიან *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. coagulans* და *B. licheniformis,* განსაკუთრებით *B. subtilis*. ფართოდ ცნობილი იაპონური პრობიოტიკული პროდუქტი „Natto„ შეიცავს სოიას ზედაპირზე გაზრდილ *B. Subtilis* var. Natto-ს ბიოფილმს. „Natto„-ს ყოველი გრამი შეიცავს 10^8 სიცოცხლიუნარიან სპორას და ჯანმრთელობასთან დაკავშირებული სასარგებლო თვისებები, მათ შორის იმუნური სისტემის სტიმულაცია ასოცირდება მის გამოყენებასთან (Hosoi and Kiuchi, 2003). *B. amyloliquefaciens*-ი ახლო კავშირშია *B. subtilis*-ს ბაქტერიასთან, რაც ექსტენსიურად შესწავლილი იქნა ისეთი

ინდუსტრიული ფერმენტების მწარმოებლების მიერ, როგორიცაა α-ამილაზა, სუბტილიზინი (პროტეაზა, რომელიც გამოიყენება სარეცხ საშუალებებსა და კონტაქტური ლინზების გამწმენდ საშუალებებში), ბარნასე (α-რიბონუკლეაზა) და ანტიბაქტერიული და სოკოსსაწინააღმდეგო პეპტიდური ანტიბიოტიკები (Yu et al., 2002). ასევე, არსებობს მონაცემები, რომ ზოგიერთ შტამს აქვს მცენარეთა გარკვეული დაავადებების ბიოლოგიური კონტროლის პოტენციალი (Chiou and Wu 2001; Tzeng et al., 2008). გარდა ამისა, შემუშავებული იქნა *B. amyloliquefaciens*-ის ეფექტიანი ფორმულა - განზავებით 1 x 10^5 კწე/მლ, ობის სოკოს კონტროლისთვის (Chiou and Wu, 2001). ყველა ზემოაღნიშნული მახასიათებლის გამო, *B. Amyloliquefaciens* წარმოადგენს იდეალურ კანდიდატს სპორების ფართომასშტაბიანი წარმოებისათვის. *Bacillus* spp.-ს უნარი გაიზარდოს ბიოფილმების ფორმით ძალზედ მნიშვნელოვანია, რადგან ბიოფილმები აგენერირებენ ნუტრიციულ-ფუნქციონალურ პროდუქტებს, რომლებშიც სპორაწარმომქმნელი პრობიოტიკული მიკროორგანიზმები ინარჩუნებენ ტექნოლოგიურ პლასტიურობას, აძლიერებენ ანტიპათოგენურ და მაღალ ფერმენტულ აქტივობას.

Bacillus spp.-ს გააჩნია პათოგენების დამთრგუნავი, ანტიოქსიდანტური, ანტიმიკრობული, იმუნომოდულატორული თვისებები (Elshaghabee et al., 2017). არსებული მონაცემებით, პრობიოტიკების ჯანმრთელობაზე სასარგებლო ზეგავლენა დამოკიდებულია ბაქტერიის გვარის, სახეობისა და შტამის სპეციფიურობაზე. აღნიშნულიდან გამომდინარე, ჩატარებული იქნა ენდოსპორაწარმომქმნელი 245 ბაქტერიული შტამის სკრინინგი *Bacillus* spp.-ს ცხოველთა საკვების ინდუსტრიაში დანამატად გამოყენებისთვის (Larsen *et al*., 2014). თავისებურებების სპექტრი, მათ შორის ანტიბიოტიკორეზისტენტობა, პათოგენების ინჰიბირების უნარი, სპორულაცია, გლიკოზილჰიდროლაზას და ბიოფილმების წარმოქმნის შესაძლებლობა განაპირობებს *B. amyloliquefaciens*-ის, *B. subtilis*-ისა და *B. mojavensis*-ის შტამების საუკეთესო პრობიოტიკულ პოტენციალს *B. licheniformis, B. megaterium* და *B. pumilus*-თან შედარებით. ბაცილის 117 იზოლატის ანტაგონისტური აქტივობის შესწავლისას გამოვლინდა, რომ 10-მა იზოლატმა ყველაზე კარგად მოახდინა სურსათისმიერი პათოგენების - *Salmonella enteritidis, Salmonella typhimurium, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Vibrio cholera* -ს ზრდის

ინჰიბირება (Thirabunyanon, Thongwittaya, 2012). როგორც აღმოჩნდა, ანტიმიკრობული აქტივობა დაკავშირებულია ბაცილის შესაძლებლობასთან, წარმოქმნას ანტიმიკრობული პეპტიდები, მცირე ზომის უჯრედგარე ეფექტორმოლეკულები და ასევე, მათ შესაძლებლობასთან იურთიერთქმედოს მასპინძელ ორგანიზმთან ერთად შემდგომში ადჰეზიისა და მიმაგრების საშუალებით (Khochamit et al., 2015).

2.2. *Bacillus* spp.-ს ზრდისა და სპორულაციის პროცესის ფიზიოლოგია

Bacillus-ის სხვადასხვა სახეობის, როგორც პრობიოტიკული დიეტური დანამატების გამოყენების სპექტრი სწრაფად გაფართოვდა მას შემდეგ, რაც შესაძლებელი გახდა კომერციულად პერსპექტიული, სპოროვან ფუძეზე დამზადებული პროდუქტების შედარებით იოლად წარმოება და ყოველდღიურად გამოსაყენებელ სურსათში მათი სიცოცხლისუნარიანობის სტაბილურად შენარჩუნება. პრობიოტიკების საწარმოო პროცესი მოიცავს რამდენიმე განსხვავებულ ეტაპს. პროცესის ოპტიმიზაციისა და პროდუქტის დიზაინის დროს გათვალისწინებული უნდა იქნეს უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობა და პრობიოტიკული აქტივობის გამოვლენა, ასევე ფერმენტაციის მკაცრი კონტროლი (საკვები არე ან სურსათის მატრიცა, pH, ნახშირბადის წყარო, ტემპერატურა და ფერმენტაციის ხანგრძლივობა) და პოსტფერმენტაციული წარმოება (გაფრქვევით შრობა, ლიოფილიზაცია, ჰომოგენიზაცია, შერევა, მაღალი წნევით ფორმის მიცემა, შეფუთვა და ა.შ.) (Foligne et al., 2013).

პრობიოტიკების ფერმენტაციისას უნდა შეირჩეს შესაბამისი საკვები არისთვის საჭირო ინგრედიენტები და მათი ზრდის პირობები ოპტიმიზებული უნდა იყოს ჟანგბადის კონცენტრაციასთან, pH-თან და ტემპერატურასთან, თუმცა, ჩვეულებისამებრ, ბუნდოვანია თუ ზრდის რომელი პირობა ახდენს გავლენას მის ფუნქციონალურ თვისებებზე (Monteiro et al., 2005, 2014; Forssten et al., 2011; Posada-Uribe et al., 2015). უნდა აღინიშნოს, რომ არა მხოლოდ ზრდის პირობები, არამედ სხვა ფაქტორებიც, მაგ. მოსავლის აღების დრო ახდენს გავლენას პრობიოტიკების ფუნქციურ თვისებებზე (Fayol-Messaoudi et al., 2005). სამწუხაროდ, ჩატარებული კვლევების უმრავლეს შემთხვევაში ვერ მოხერხდა შეფასება, თუ ზრდის რომელი

კონკრეტული პირობა ახდენს გავლენას ბაცილის ფუნქციონალურ თვისებებსა და მისგან მიღებული პროდუქტების ეფექტიანობაზე.

სპორაწარმომქმნელი ბაქტერიების წარმოების ეფექტიანი ტექნოლოგიის განსავითარებლად საჭიროა განიმარტოს ბაცილის ზრდისა და სპორულაციის ფიზიოლოგიური რეგულირების მექანიზმი (ზრდის გაძლიერება ან ინჰიბირება) და შესწავლილ იქნეს ორივე პროცესისთვის საკვები არისადმი ოპტიმალური მოთხოვნები. ცხადია, პრობიოტიკების წარმადობის გაზრდის გონივრული სტრატეგია მდგომარეობს იმაში, რომ უჯრედების მაღალი სიმჭიდროვის უზრუნველსაყოფად შემუშავებული იქნეს კულტივირების შესაბამისი პირობები და შემდგომში მოხდეს სპორულაციის გაუმჯობესება. თუმცა, ლიტერატურული მონაცემემების ანალიზი აჩვენებს, რომ დღემდე *Bacillus* spp.-ს შტამების მხოლოდ მცირე რაოდენობაა შესწავლილი და თანამედროვე ცოდნა მათი ფიზიოლოგიის შესახებ ჯერ კიდევ არასაკმარისია, რათა ეფექტიანად იქნეს რეალიზებული მათი ბიოტექნოლოგიური პოტენციალი საწარმოო მასშტაბით. გარდა ამისა, მონაცემების მიხედვით, არსებობს სხვადასხვა ოპტიმალური საკვები არე და კულტივირების პირობები ბაცილის სპორულაციისთვის, რომლის თანახმადაც თითოეულ შტამს გააჩნია ინდივიდუალური კვებითი მოთხოვნილება და ოპტიმალური პირობები.

სპორულაციის ჰომოგენური პირობები, ზრდისა და სპორულაციის პარამეტრების ზუსტი რეგულირება წარმოადგენს უმნიშვნელოვანეს ფაქტორებს განახლებადი და ჰომოგენური პროდუქტის მისაღებად. სასურველია, გამოყენებულ იქნეს ცნობილი ქიმიური შემადგენლობისა და განსაზღვრული რაოდენობის საკვები არე, რომელიც უზრუნველყოფს *Bacillus* spp.-ს სწრაფ ზრდას და ეფექტიან სპოროგენეზს. პრობიოტიკების კომერციული წარმოებისთვის, მიკროორგანიზმების ოპტიმალური ზრდისა და სპორულაციისთვის აუცილებელია ყურადღებით შეირჩეს როგორც ნახშირბადისა და აზოტის წყაროები, ასევე სხვა მინერალური დანამატები.

2.3. ნახშირბადის წყაროს გავლენა

ჩვეულებისამებრ, ლაბორატორიებში სპორულაციისთვის გამოიყენება კომპლექსური შემადგენლობის საკვები არეები, რომლებიც შეიცავენ პეპტონს, საფუარის ექსრაქტს,

კაზეინის ჰიდროლიზატს, ასევე მინერალებს - რკინას, მაგნიუმს, კალციუმს, სპილენძს, მანგანუმსა და თუთიას სხვადასხვა კომბინაციითა და კონცენტრაციით. ასეთ საკვებ არეში სპორაწარმომქმნელი ბაქტერია იზრდება საკვები ინგრედიენტების ამოწურვამდე და შემდგომ, სპორულაცია მიმდინარეობს სპონტანურად. თუმცა, ეს საკვები არე ჩვეულებისამებრ, იწვევს სპორების ჰეტეროგენურ და არასტაბილურ პროდუცირებას (de Vries et al., 2004). ზრდისა და სპორულაციის პარამეტრების ზუსტი რეგულირება ქიმიურად განსაზღვრული საკვები არის მეშვეობით წარმოადგენს უმნიშვნელოვანეს ფაქტორს სპორების ჰომოგენური და სტაბილური პროდუქტის მისაღებად. ამჟამად, ზრდისა და სპორულაციისთვის ხშირად გამოიყენება ქიმიურად განსაზღვრული სინთეზური საკვები არეები, მაგრამ ყველა ფაქტორი, რომელსაც შეუძლია გავლენა მოახდინოს პროდუქტის ფორმირებაზე (ბიომასა და სპორების აკუმულაცია) უნდა იყოს ოპტიმიზებული.

განსაკუთრებით აღსანიშნავია, რომ ნახშირბადის წყარო და მისი კონცენტრაცია საკვებ არეში თამაშობს გადამწყვეტ როლს ბაცილის ზრდისა და სპორულაციის პროცესში. ამ მიზნით, ვარინერისა და ვაიეტის (Warriner and Waites, 1999) მიერ ტესტირებულ იქნა რამდენიმე ნახშირწყალი (ყველა შემთხვევაში ნახშირწყლების საბოლოო ჯამური კონცენტრაცია იყო 5.7 მილიმოლი/ლ), რათა გამოევლინათ, ნახშირბადის რომელი წყარო აუმჯობესებს სპორულაციას *B. Subtilis* PS 346-ის კულტივირებისას. გლუკოზის შემცველ საკვებ არესთან შედარებით, რაფინოზამ, საქაროზამ და ფრუქტოზამ განაპირობა სპორების დაბალი გამოსავლიანობა და ისინი ფაქტობრივად აინჰიბირბდნენ სპორულაციას, მაშინაც კი, როცა მათი გამოყენება მოხდა გლუკოზასთან კომბინაციაში. დადგინდა, რომ რაფინოზის, საქაროზისა და ფრუქტოზის თანაობისას, სპორების დაბალი გამოსავლიანობა არ იყო დაკავშირებული ბაქტერიების ზრდის სიჩქარესთან ან ბიომასასთან. აღნიშნული მიუთეთებს, რომ ზრდის ისეთ სუბსტრატებზე, როგორიცაა რაფინოზა, საქაროზა და ფრუქტოზა, უჯრედების მნიშვნელოვანი რაოდენობა სტაციონარული ფაზის დაწყების შემდეგ არ ახდენს სპოროგენეზის ინიცირებას. ამის საპირისპიროდ, გლუკოზის ჩანაცვლება პენტოზით, რიბოზით ან არაბინოზით ორჯერ ზრდის *B. subtilis*-ის სპორების გამოსავლიანობას, კულტივირებისას. გარდა ამისა, ნახშირბადის წყაროდ გლუკონატის გამოყენება 5-

ჯერ ზრდის ბაცილის სპორების გამოსავლიანობას. განსაკუთრებით იმ დროს, როდესაც ორმაგი გლუკონატი სუბსტრატი - რიბოზა ან არაბინოზა მიეწოდებოდა გლუკოზასთან ერთად, სპორების გამოსავლიანობა გაიზარდა 11-ჯერ, 14-ჯერ და 19-ჯერ, შესაბამისად. სპორულაციის ზრდა აგრეთვე გამოვლინდა გლუკოზის შემცველ საკვებ არეზე პირუვატის და არა ციტრატისა და მალატის დამატებისას. მიღებული შედეგებიდან გამომდინარე, ავტორებმა ივარაუდეს, რომ სპორულაციის ზრდის ეფექტი გამოიწვია ორი სუბსტრატის ერთდროულად მიწოდებამ და დაასკვნეს, რომ პირუვატი თამაშობს რეგულატორულ როლს სპოროგენეზის პროცესში.

განსხვავებული სტრუქტურისა და შემადგენლობის ნახშირბადის წყაროს რაოდენობის (11 გ/ლ) გავლენის შესწავლით გამოვლინდა, რომ *B. subtilis* WHK-Z12-ის 48 საათიანი სიღრმული ფერმენტაციისას სანჯღრეველაზე (30^{0}C, 250 ბრუნი/წთ) ნახშირბადის წყაროებიდან - პოლისაქარიდებიდან უფრო უკეთესი აღმოჩნდა მონოსაქარიდები და დისაქარიდები (Chen et al., 2010). სიმინდის სახამებელმა განაპირობა სპორების ყველაზე მაღალი გამოსავლიანობა (2.73 x 10^9 კწე/მლ), შედარებით დაბალი შედეგი - კარტოფილის სახამებელმა (1.95 x 10^9 კწე/მლ). გამოსავლიანობის ამდაგვარი გაუმჯობესება შეიძლება განპირობებული იყოს სიმინდის სახამებლის უნარით, ნელა მოახდინოს თხევად კულტურაში გლუკოზის ჰიდროლიზი, როდესაც სპორულაციასა და ზრდაზე კატაბოლიტური წნეხი შეამსუბუქა გლუკოზამ. მონოსაქარიდებსა და დისაქარიდებს შორის D-მალტოზამ და D-ქსილოზამ უზრუნველყო სპორების მაღალი გამოსავლიანობა (1.60-1.83 x 10^9 კწე/მლ), სხვა ნახშირწყლებმა, გლუკოზის ჩათვლით კი მნიშვნელოვნად შეამცირა სპორების გამოსავლიანობა (8.55 x 10^8 კწე/მლ). განსაკუთრებით, *B. Subtilis* WHK-Z12-ს სპორების ფორმირებისთვის D-ლაქტოზა აღმოჩნდა ნახშირბადის ყველაზე ღარიბი წყარო (2.65 x 10^8 კწე/მლ). *B. amyloliquefaciens* B128-ს სპორების წარმოებისთვის, გლუკოზასა და მალტოზასთან შედარებით, ლაქტოზა გამოდგა ნახშირბადის საუკეთესო წყარო (Rao et al., 2007). მიუხედავად ამისა, ნახშირბადის წყაროების შედარებით მაღალი კონცენტრაციის (20 გ/ლ) გამოყენებით კულტივირებისა, საკვებ არეში, რომელიც შეიცავდა სოიას პეპტონს, როგორც აზოტის წყაროს, ბაცილის მიერ ლაქტოზის, გლუკოზისა და მალტოზის თანაობით წარმოებულ იქნა 4.28 x 10^8 კწე/მლ, 0.88 x 10^8 კწე/მლ და 0.67 x 10^8 კწე/მლ.

უფრო მეტიც, ნახშირბადის წყაროს კონცენტრაცია შეიძლება თამაშობდეს გადამწყვეტ როლს ინდივიდუალურად ბაცილის სპოროგენეზის პროცესში. ამგვარად, მონტეირომ და სხვებმა (Monteiro et al. 2005) შეაფასეს გლუკოზის ეფექტი *B. subtilis* შტამი MB24-ის ზრდასა და სპორულაციაზე 2 ლ ტევადობის ბიორექტორში, იცვლებოდა რა გლუკოზის საწყისი კონცენტრაცია 3.5 გ/ლ-სა და 20 გ/ლ-ს შორის. ვეგეტატური უჯრედების კონცენტრაცია მაქსიმუმამდე იზრდებოდა გლუკოზის კონცენტრაციის მხოლოდ 5 გ/ლ-მდე პარალელურად მომატებასთან ერთად. გლუკოზის კონცენტრაციის შემდგომმა მომატებამ აღარ გამოიწვია ბიომასის ზრდა, მაგრამ გლუკოზის 5 გ/ლ-ზე უფრო მაღალმა კონცენტრაციამ შეამცირა სპორულაცია. საწყისი კონცენტრაციით 5 გ/ლ-მდე საკვებ არეში დამატების შემთხვევაში გლუკოზა მოხმარებულ იქნა ექსპონენციური ზრდის დასრულებამდე, მაშინ, როდესაც გლუკოზის უფრო მაღალი საწყისი კონცენტრაციის შემთხვევაში, მისი მოხმარება კვლავ ხდებოდა სტაციონარული ფაზის მიმდინარეობისას. მოგვიანებით, სანჯღრეველაზე კულტივირების პირობებში, იგივე ავტორების მიერ (Monteiro et al., 2014) ტესტირებული იქნა სხვა *B. subtilis*-ის შტამი 210 სპორების პროდუცირებისთვის უფრო ეფექტიანი საკვები არის დასადგენად და მოხდა მისი შედარება სპორების პროდუცირებისთვის გამოყენებულ სტანდარტულ კომპლექსურ საკვებ არესთან (Difco-ს სპორულაციის საკვები არე, DSM). საკვები არე შეიცავდა მარილებს გლუკოზას, გლიცეროლსა და ლიმონის მჟავასთან ერთად ან გლუკოზისა და გლიცეროლის კომბინაციასთან ერთად. მიღებულმა შედეგებმა აჩვენა, რომ ქიმიურად განსაზღვრული საკვები არეების გამოყენებით ჩატარებული ყველა ექსპერიმენტისას სპორების პროდუცირება იყო დაბალი, ვიდრე DSM-ის გამოყენებით განხორციელებული ექსპერიმენტის დროს. ქიმიურად განსაზღვრული საკვები არის თანაობით ჩატარებული ექსპერიმენტების ფარგლებში *B. subtilis* შტამ MB24-ზე ადრე ჩატარებული ექსპერიმენტებისგან განსხვავებით, საუკეთესო შედეგი მიღებულ იქნა გამოყენებულ საკვებ არეზე, ნახშირბადისა და აზოტის წყაროს მაღალი კონცენტრაციის პირობებში. აღსანიშნავია, რომ გლუკოზის 4-დან 20 გ/ლ-მდე კონცენტრაციის მომატებამ 5-ჯერ გაზარდა ბაცილის სპორების რაოდენობა. გლუკოზის კონცენტრაციის შემდგომმა მატებამ კი შეაჩერა სპორების პროდუცირება.

პოსადა-ურიბესა და სხვების მიერ (Posada-Uribe et al., 2015) ტესტირებულ იქნა თხუთმეტი საკვები არე Plackett-ისა და Burman-ის დიზაინით და მხოლოდ ოთხზე (M1, M4, M11 და M15) მოხდა სპორების პროდუცირება *B. subtilis* EA-CB0575-ის 96 საათიანი კულტივირების შემდეგ. ამ საკვებ არეებს ჰქონდათ გლუკოზის დაბალი შემცველობა (2.0 გ/ლ) და განაპირობეს სპორაწარმომქმნელი უჯრედების სიმჭიდროვე და სპორულაციის ეფექტიანობა, შესაბამისად, 0.51 x 10^9 კწე/მლ-სა და 1.87 x 10^9 კწე/მლ-ს შორის და 50.7 %-სა და 93.2%-ს შორის. საკვებ არე M11-ს ჰქონდა სპორების ყველაზე მაღალი გამოსავლიანობა (1.87 x 10^9) და სპორულაციის ყველაზე მაღალი ეფექტიანობა (93.2%). მნიშვნელოვანია აღინიშნოს, რომ გლუკოზის მაღალი რაოდენობით შემცველობის (11 გ/ლ) საკვებ არეზე არ მოხდა სპორების წარმოქმნა. ავტორებმა ივარაუდეს, რომ ეს ფენომენი დაკავშირებულია სპორულაციის კატაბოლიტური რეპრესიით კონტროლთან, რამდენადაც, გლუკოზა შესაძლებელია ჩართული იყოს რამდენიმე ფერმენტის ინჰიბირებაში, რომლებიც, სულ ცოტა, პასუხისმგებელი არიან სპორულაციაზე. გარდა ამისა, სპორულაციაზე გლუკოზის უარყოფითი ეფექტი, სავარაუდოდ, გამოწვეულია ჭარბი გლუკოზის მიერ სპორულაციის spo0A გენის ტრანსკრიპციის რეპრესიით (Sonenshein, 2000). ეს მონაცემები ცხადყოფს, რომ კულტურის საკვებ არეში გლუკოზის კონცენტრაცია უნდა შემცირდეს, რათა გაიზარდოს სპორულაციის ეფექტიანობა და სპორების გამოსავლიანობა. უფრო მეტიც, აშკარაა, რომ ნახშირბადის წყაროს ამოწურვა *B. subtilis*-ის სპორულაციის ძირითადი სტიმულია.

B. megaterium BA-019-ის უჯრედების ზრდა მნიშვნელოვნად გაუმჯობესდა, როდესაც ნახშირბადის წყაროდ, უკეთესი შედეგით, გამოყენებულ იქნა მელასა (6.25 და 7.05 გ/ლ), ვიდრე საქაროზა (2.83 და 1.96 გ/ლ) ამონიუმის სულფატთან და შარდოვანასთან ერთად, როგორც აზოტის წყარო (Kulpreecha et al., 2009). ავტორები მელასას განიხილავენ როგორც ზრდის სათანადო სუბსტრატს, შეიცავს რა სხვადასხვა ნუტრიენტს (გარდა გლუკოზისა, ფრუქტოზისა და საქაროზისა), ორგანულ მჟავებს, მინერალებს და ვიტამინებს, როგორებიცაა თიამინი, რიბოფლავინი და პირიდოქსინი, რომლებიც მოქმედებენ როგორც ზრდის ფაქტორები და რისი შედეგიცაა უფრო მაღალი უჯრედული ზრდა. ნახშირბადისა და აზოტის C/N მოლარული თანაფარდობის ზეგავლენის შესწავლის დროს მელასას 20 გ/ლ

ფიქსირებული კონცენტრაციით გამოყენებისას და შარდოვანას კონცენტრაციის 0,2-დან 2 გ/ ლ-მდე ვარირებისას, აღმოჩნდა, რომ უჯრედული ბიომასა იყო უმაღლესი, როდესაც C/N თანაფარდობა იყო 25.

2.4. ზრდის ლიგნოცელულოზური სუბსტრატის გავლენა

პრობიოტიკების წარმოების ღირებულება მნიშვნელოვნადაა დამოკიდებული ფერმენტაციისთვის გამოყენებული საკვები არის შემადგენლობაზე. განსაკუთრებით, წარმოების თვითღირებულების შემცირება შესაძლებელია პრობიოტიკული მიკრობების ზრდის სუბსტრატად აგროსასურსათო ინდუსტრიის ნედლეულის გამოყენების ხარჯზე. მიუხედავად აღნიშნულისა, ლიტერატურაში საკმაოდ შეზღუდულია ინფორმაცია, რომელიც აღწერს ლიგნოცელულოზური სუბსტრატების ეფექტიანობას ბაცილის სპორების ფორმირებასთან დაკავშირებით. კერძოდ, საკვებ არეში ტაპიოკას (16.7 გ/ლ) კომბინაციით ლაქტოზასთან (12.7 გ/ლ) *B. amyloliquefaciens* subsp.B128-ს სიღრმული კულტივირებისას მიღებული იქნა სპორების გამოსავლინობა 5.92×10^8 სპორა/მლ (Rao et al., 2007). *B. subtilis*-ის შტამის კულტივირებამ საკვებ არეში $(NH_4)_2SO_4$-ის 4.54% შემცველობით სიმინდის ფქვილთან (1.2%) ერთად განაპირობა სპორების მაქსიმალური რაოდენობით პროდუცირება (Shi and Zhu, 2007). ეს შედეგები ცხადყოფენ, რომ სხვადასხვა ლიგნოცელულოზური ნედლეული შესაძლებელია გამოყენებული იქნეს ზრდის სუბსტრატად სპორაწარმომქმნელი ბაქტერიის კულტივირებისთვის.

ბოლო კვლევების თანახმად, *B. amyloliquefaciens* BS-20-ის სპორების პროდუცირებაზე სიმინდისა და სოიას ფქვილმა იქონია დადებითი გავლენა (Ren et al., 2018). თუმცა, ხორბლის ქატოსა და მელასას ეფექტი აღმოჩნდა უმნიშვნელო. ექსპერიმენტების გადამოწმებული შედეგებიდან გამომდინარე, ოპტიმიზებულმა საკვებმა არემ (გლუკოზა 8 გ/ლ, საქონლის ხორცის ექსტრაქტი 7.2 გ/ლ, სიმინდის ფქვილი 9.0 გ/ლ, სოიას ფქვილი 9.5 გ/ლ, Mn^{2+} 1,0 მილიმოლი, Fe^{2+} 3.0 მილიმოლი და Ca^{2+} 2.1 მილიმოლი) განაპირობა სპორების გამოსავლიანობის 8.8-ჯერ ზრდა კონტროლთან შედარებით (გლუკოზა 8 გ/ლ, საქონლის ხორცის ექსტრაქტი 7.2 გ/ლ,

NaCl 10 გ/ლ). ამ საკვებ არეში ბაცილის მიერ პროდუცირებული იქნა 8.05 × 10^9 კწე/მლ.

საინტერესო მიდგომა გამოიყენეს ვანგკა - ორმმა (Wangka-Orm et al., 2014). აღნიშნული მკვლევარების მიერ ტკბილი კარტოფილიდან, კასავას ფესვებიდან და ბრინჯიდან მიღებულ იქნა წყლიანი ექსტრაქტები, რასაც დაემატა 20 გ/ლ დექსტროზა და მომზადებული სუბსტრატები გამოყენებულ იქნა *Bacillus* KKU02 და *Bacillus* KKU03-ის შტამების სპორების პროდუცირებისთვის, სიღრმული ფერმენტაციისას. მხოლოდ კასავას ფესვებისა და ტკბილი კარტოფილის დამატებამ გამოიწვია სპორების თანაბარი ან უფრო მეტი რაოდენობით კონცენტრირება საკვებ ბულიონში. კასავას მოხარშულ საკვებ არეში 0,1 გ/ლ $MgSO_4$-სა და 2 გ/ლ $(NH_4)_2SO_4$-ის დამატებამ გამოიწვია ორივე შტამის სპორების პროდუცირების 1,75-ჯერ გაზრდა. შესაბამისად, სპორების ყველაზე მაღალმა კონცენტრაციამ შეადგინა *Bacillus* KKU02-სათვის 1.62 x 10^8 და *Bacillus* KKU03-სათვის 6.61 x 10^7 სპორა/მლ. სპორების პროდუცირებისთვის ტესტირებულ იქნა კასავას სხვასხვა კონცენტრაცია 50-დან 200 გ/ლ-მდე და სპორების ყველაზე მაღალი გამოსავლიანობა მიღებულ იქნა კასავას 100 გ/ლ კონცენტრაციის შემთხვევაში (1.78 x 10^8 და 1.48 x 10^8 სპორა/მლ, შესაბამისად ორივე შტამისთვის).

2.5. აზოტის წყაროს გავლენა

მხოლოდ მკვლევართა რამდენიმე ჯგუფის მიერაა შესწავლილი აზოტის წყაროს გავლენა ბაცილის ზრდასა და სპორების პროდუცირებაზე. წინა რამდენიმე კვლევამ დაადასტურა, რომ ორივე - აზოტის წყაროს ბუნება და კონცენტრაცია წარმოადგენს გადამწყვეტ ნუტრიციულ ფაქტორს, რაც გავლენას ახდენს ბაცილის ზრდასა და სპორების პროდუცირებაზე. ტესტირებულ იქნა *B. subtilis* WHK-Z12-ის სპორაწარმოებაზე აზოტის შემცველი სხვადასხვა ნუტრიენტის ეფექტი D-გლუკოზის მონოჰიდრატის თანაობისას, როგორც ნახშირბადის მუდმივად ცვლადი წყარო, ბაცილების სიღრმული ფერმენტაციისას (Chen et al., 2010). სიმინდის ექსტრაქტი აღმოჩნდა საუკეთესო წყარო სპორების პროდუცირებისთვის (1.73 x 10^9 კწე/მლ), რასაც მცირედით ჩამორჩა სოიას ფქვილი და საფუარის ექსტრაქტი. ავტორებმა

ივარაუდეს, რომ სიმინდის ექსტრაქტმა და სოიას ფქვილმა, როგორც აზოტით მდიდარმა ნუტრიენტებმა გააუმჯობესეს სპორების გამოსავლიანობა და უზრუნველყვეს პროცესი ზრდისთვის აუცილებელი ამინომჟავებით (შესაბამისად, 19.18% და 43.83% ამინომჟავები), ასევე, ბაცილის ზრდა და სპორულაცია უზრუნველყვეს ზრდის გარკვეული ფაქტორებით. ამავე დროს, ტესტირებულ აზოტის კომპლექსურ წყაროებს შორის, სოიასა და ხორცის პეპტონის, როგორც აზოტის ერთადერთი წყაროს გამოყენებით მიღებულ იქნა სპორების დაბალი გამოსავლიანობა (0.40-1.56 x 10^8 კწე/მლ, შესაბამისად). უფრო მეტიც, ამინომჟავები და არაორგანული ამონიუმის ფოსფატი გამოდგნენ აზოტის ყველაზე ცუდი წყაროები, გამოსავლიანობით მხოლოდ 0.2-0.36 x 10^9 კწე/მლ. მნიშვნელოვანია აღინიშნოს, რომ ამ კვლევებში მკვლევარებმა *B. subtilis* WHKZ12-ს სპორების პროდუცირებისთვის 30 ლ ტევადობის ფერმენტიორში გამოიყენეს ნუტრიენტული ინგრედიენტების უნიკალური კომბინაცია. სიმინდის სახამებლის, ხორბლის ქატოს, სიმინდის ფქვილის, სიმინდის ექსტრაქტის, სოიას ფქვილის და საფუარის ექსტრაქტის ოპტიმალური კონცენტრაციებით გამოყენებით, 40 საათიანი ფერმენტაციის შემდეგ მიღებულ იქნა სპორების მაქსიმალური გამოსავლიანობა - 1.56 x 10^{10} კწე/მლ.

რაოს და სხვების მიერ (Rao et al. 2007) შედარებულ იქნა *B. amyloliquefaciens* B128-ის სპორების გამოსავლიანობაზე აზოტის სხვადასხვა წყაროს ზეგავლენა და დაადგინეს, რომ ბაცილის კულტივირების დროს ლაქტოზის შემცველ საკვებ არეში აზოტის წყაროდ გამოყენებულ პეპტონის ან სოიას ფქვილზე, შესაბამისად, $(NH_4)_2SO_4$-ის დამატებამ ორჯერ გაზარდა სპორების გამოსავლიანობა. შემდგომი ოპტიმიზაციისათვის, მათემატიკურ-სტატისტიკური მეთოდოლოგიის გამოყენებით, ავტორებმა დაადგინეს *B. amyloliquefaciens* B128 კულტივირების ოპტიმალური პარამეტრები (გ/ლ), კერძოდ: 12.7 ლაქტოზა, 16.7 ტაპიოკა, 1.8 ამონიუმის სულფატი და 8.0 პეპტონი. ასეთ საკვებ არეში სპორების გამოსავლიანობა იყო 5.93 x 10^8 კწე/მლ.

2.6. საკვები არის pH-ის გავლენა

რამდენიმე ავტორის მიერ აღწერილია საკვები არის pH-ის გავლენა ბაცილის ზრდასა

და სპორულაციაზე. *B. amyloliquefaciens* B-128-ის სანჯღრეველაზე ექსპერიმენტისას ტზენგის და სხვების (Tzeng et al., 2008) მიერ ნაჩვენები იქნა, რომ საწყის ტუტე pH-მა 8.0 მნიშვნელობით განაპირობა სპორების პროდუქტიულობის გაზრდა 10.30 x 10^8 სპორა/მლ-მდე, საკონტროლო ვარიანტის კულტივირებისას გამოსავლიანობა იყო 7.96 x 10^8 სპორა/მლ (pH-ის კონტროლის გარეშე). აღნიშნულისგან განსხვავებით, მჟავა pH-ის (6.0 და 5.0) რეაქცია მნიშვნელოვნად აფერხებს სპორების პროდუცირებას. საინტერესოა, რომ pH სასტარტო სიდიდით 9.0 და 8.0, საკვები არის 48 საათიანი კულტივირების ბოლოს, შესაბამისად, იყო 7.34 და 7.08, მაშინ როდესაც სასტარო pH 7.0-ის ან უფრო დაბალი სიდიდის შემთხვევაში აღინიშნა საკვები არის pH-ის უმნიშვნელო შემცირება. სხვა სურათი იქნა ნაჩვენები, როდესაც *B. amyloliquefaciens* B-128-ის კულტივირება მოხდა 20 ლ ტევადობის „airlift“ ბიორეაქტორში აერაციის 1.5 ლ/ლ/წთ სიჩქარეზე. სპორების პროდუცირების პროცესი კონტროლდებოდა pH-ის ორ განსხვავებულ მაჩვენებელზე (7.0 და 8.0) და დარდებოდა არაკონტროლირებად pH-ის პირობებში ოპერირებასთან. pH-ის შესწავლილ სამ სიდიდეს შორის, სპორების გამოსავლიანობის მხრივ, უმნიშვნელო განსხვავება იქნა აღმოჩენილი კულტივირების ბოლოს. თუმცა, უნდა აღინიშნოს, რომ არაკონტროლირებადი pH-ით ექსპერიმენტის დროს, პროცესის ბოლოს, ვეგეტატური უჯრედების კონცენტრაცია გაიზარდა მნიშვნელოვნად და შეადგინა 8.6 x 10^9 კწე/მლ, რაც 6-ჯერ აღემატება კონტროლირებადი pH კულტივირების დროს მიღებულ კონცენტრაციას.

pH-ის კონტროლის გარეშე 2 ლ ტევადობის ბიორეაქტორში *B. subtilis*-ის კულტივირებას თან ახლდა pH-ის შემცირება 6.7-დან 6.5-მდე, ზრდის ექსპონენციურ ფაზაში, რის შემდეგაც, ზრდის ექსპონენციური ფაზის ბოლოს გამოვლინდა pH-ის მკვეთრი ზრდა 8.1-მდე, ასევე, pH-ის მცირედით მომატება 9.0-მდე, სპორულაციის პროცესის განმავლობაში (Monteiro et al., 2005). ასეთ პირობებში, ვეგეტატური უჯრედების მაქსიმალურმა კონცენტრაციამ მიაღწია 2.6 x 10^9 უჯრედს/მლ-ში, მაგრამ სპორულაციის ეფექტიანობა იყო დაბალი (დაახლოებით 16 %) და სპორების საბოლოო კონცენტრაციამ მიაღწია 4.2 x 10^8 სპორას/მლ-ში.

B. subtilis-ის კულტივირებამ კონტროლირებადი pH-ის პირობებში აჩვენა, რომ pH-ის 6.0-9.0 დიაპაზონში სპორულაციის ეფექტიანობა (დაახლოებით 50%) არ იყო დამოკიდებული საკვები არის pH სიდიდეზე, მაშინ როცა pH-ის 5.0-მდე შემცირებამ

მკვეთრად შეამცირა სპორულაციის ეფექტიანობა 6%-მდე. 7.5 pH-ზე, პროცესის ბოლოს, სპოროვანი ფრაქცია იყო რამდენადმე მაღალი, ვიდრე ყველა სხვა ექსპერიმენტის დროს, ვეგეტატური უჯრედების კონცენტრაციის მაქსიმუმამდე გაზრდასთან 7.5 x 10^9 უჯრედი/მლ და სპორულაციის ეფექტიანობის დაახლოებით 50%-ით გაზრდასთან ერთად. ყოველივე აღნიშნულმა განაპირობა სპორების საბოლოო კონცენტრაცია 3.6 x 10^9 სპორა/მლ, რაც ნიშნავს გამოსავლიანობის 9-ჯერ მომატებას არაკონტროლირებად pH-ის ექსპერიმენტთან შედარებით.

პოსადა-ურიბესა და სხვების მიერ (Posada-Uribe et al., 2015), ბიორეაქტორის დონეზე შესწავლილ იქნა pH-ის გავლენა *B. subtilis* EA-CB00575-ის სპორების პროდუცირებაზე. თუმცა, საკვები არის pH-ის მუდმივ სიდიდეზე (6.5 ან 7.0) შენარჩუნებამ ან არაკონტროლირებად pH-ის პირობებში ბიორეაქციამ არ იქონია მნიშვნელოვანი გავლენა საერთო უჯრედულ ბიომასაზე, სპოროვანი უჯრედების სიმჭიდროვესა და სპორულაციის ეფექტიანობაზე არაკონტროლირებად პირობებში და მაშინ, როდესაც pH იცვლებოდა 5.5-სა და 7.0-ს შორის 48 საათიანი ფერმენტაციისას, მიღწეულ იქნა სპოროვანი უჯრედების სიმჭიდროვე 2.27 x 10^9 კწე/მლ და სპორულაციის ეფექტიანობა 92.9%, შესაბამისად.

2.7. მორევისა და აერაციის გავლენა

განსაზღვრულ საკვებ არეში, 5 ლ ტევადობის ბიორეაქტორში 0.5 ლ/ლ/წთ აერაციისას, *B. amyloliquefaciens* B-128-ის სპორების პროდუცირებაზე მორევის ეფექტის შესწავლამ აჩვენა, რომ სპორების პროდუცირება დაიწყო 30 საათის შემდეგ და მაქსიმალურ რაოდენობას - 4.65 x 10^8 სპორა/მლ-ს მიაღწია ინოკულაციის 48 საათიანი პროცესის შემდგომ, მორევის შედარებით დაბალ სიჩქარეზე - 200 ბრუნი/წუთში (Tzeng et al., 2008). ამის შემდეგ, სპორების პროდუცირების მნიშვნელოვანი ზრდა არ მომხდარა. აღნიშნულისგან განსხვავებით, მორევის სიჩქარეზე 300 ბრუნი/წუთში, სპორების პროდუცირება დაიწყო 50 საათის შემდეგ და 100 საათიანი ინოკულაციის შემდეგ მიაღწია 3.56 x 10^8 სპორა/მლ-ს. ორ სხვადასხვა სიჩქარეზე მორევის ტესტირებისას, განსხვავებული იყო მარედუცირებელი შაქრების კონცენტრაციის ცვლის დინამიკა, სადაც შაქრების ასიმილაცია შემცირდა შერევის სიჩქარის ცვლილებაზე 200-დან 300

ბრუნამდე წუთში. ავტორების მოსაზრებით, ეს შესაძლებელია განპირობებული იყოს მაღალ სიჩქარეზე მორევით გამოწვეული სტრესის გამო, რამაც შეიძლება თავის მხრივ გამოიწვიოს სტრესისადმი სენსიტიური მიკროორგანიზმების ზრდის შესუსტება და აერობული კულტივირების პირობებში სპორების გამოსავლიანობაზე გავლენა. იგივე მკვლევარებმა 20 ლ ტევადობის „airlift“ რეაქტორში მოახდინეს აერაციის სიჩქარის ოპტიმიზაცია, სადაც კულტივირება მიმდინარეობდა 1.5-დან 3.0 ლ/ლ/წთ-მდე აერაციის სიჩქარეზე. აერაციის შესწავლილ სიჩქარეებს შორის სპორების მაქსიმალური კონცენტრაცია 3.82 x 10^9 სპორა/მლ მიღწეულ იქნა 2.5 ლ/ლ/წთ სიჩქარეზე 29 საათიანი ინოკულაციის შემდგომ, რაც 5-ჯერ აღემატება 1.5 ლ/ლ/წთ სიჩქარეზე მიღებულ კონცენტრაციას.

მონტეიროსა და სხვების მიერ (Monteiro et al., 2005) გამოკვლეულ იქნა გახსნილი ჟანგბადის კონცენტრაციის ეფექტი *B. subtilis*-ის ზრდასა და სპორულაციაზე, რეაქტორში სატურირებული ჟანგბადის 10%, 30% და 50% კონცენტრაციაზე. შედეგებმა აჩვენა, რომ ამ პარამეტრმა არ მოახდინა გავლენა მიკროორგანიზმის ზრდაზე, თუმცა, ხსნადი ჟანგბადის 30% სატურირებისას მიღწეულ იქნა სპორების კონცენტრაციის უმნიშვნელო ზრდა. ანალოგიურად, უმნიშვნელო აღმოჩნდა გახსნილი ჟანგბადის ზეგავლენა მელასაზე დამზადებულ საკვებ არეში *B. megaterium* BA-019-ის ბიომასის გამოსავლიანობაზე, 7.0 pH-ის პირობებში (Kulpreecha et al., 2009). ყველაზე მაღალი უჯრედული ბიომასა იქნა მიღებული 60% გახსნილი ჟანგბადის პირობებში (8,78 გ/ლ) რასაც მოსდევდა 80% (8.26 გ/ლ) და 40% (6.38 გ/ლ) კონცენტრაციები, შესაბამისი შედეგებით. მკვლევარები ხაზგასმით აღნიშნავენ, რომ გახსნილი ჟანგბადის 40% კონცენტრაციის შემთხვევაში კულტივირების დრო გაიზარდა და კულტურის ბულიონში პროდუქტიულობა შემცირდა მკვეთრად, ჟანგბადის არასაკმარისი რაოდენობის გამო, აერობული ანაბოლიკებისთვის ჟანგბადზე მოთხოვნილების დასაკმაყოფილებლად. თუმცა, გახსნილი ჟანგბადის უფრო მაღალმა კონცენტრაციამ (80%) შეამცირა ბაქტერიული ზრდა დამჟანგავი და მექანიკური (მაღალი შემრევი სიჩქარის) სტრესის გამო. ავტორები მივიდნენ დასკვნამდე, რომ გახსნილი ჟანგბადის კონცენტრაცია მნიშვნელოვანია სპორების პროდუცირებისთვის, ოპტიმალური, 30%-ზე მაღალი კონცენტრაციით.

B. subtilis EA-CB0575-ის სპორების პროდუცირებაზე ფერმენტიორში, pH-ის არაკონტროლირებად პირობებში, მორევისა და აერაციის სიჩქარის ზეგავლენის განსასაზღვრად პოსადა-ურიბესა და სხვების მიერ (Posada-Uribe et al., 2015) შეფასდა ოპერირების პირობები მორევის სიჩქარეზე 300-500 ბრუნი/წუთში და აერაციის სიჩქარეზე 8-16 ლ/წუთში. ამ პირობებში უჯრედების სიმჭიდროვე იყო 1.24 x 10^9 კწე/მლ და 9.33 x 10^9 კწე/მლ, ხოლო სპორულაციის ეფექტიანობა - 78.9–96.2 %, შესაბამისად, რამაც აჩვენა სპოროვანი უჯრედების სიმჭიდროვის 6.8-ჯერ მატება, სანჯღრეველაზე კულტივირებასთან შედარებით. სპოროვანი უჯრედების ყველაზე მაღალი რაოდენობა - 9.33 x 10^9 კწე/მლ და ასევე სპორულაციის ეფექტიანობა 91.2% მიღებულ იქნა 400 ბრუნი/წუთში და 12 ლ/წუთში მორევისა და აერაციის სიჩქარის პირობებში. ეს შედეგები შესაბამისობაშია სხვადსხვა მონაცემებთან, რომელთა თანახმადაც მორევისა და აერაციის სიჩქარის გაზრდა უფრო მეტად აუმჯობესებს *Bacillus*-ის სხვადასხვა სახეობების ბიომასისა და მეტაბოლიტების პროდუცირებას (Feng et al., 2003).

უნდა აღინიშნოს, რომ ლიტერატურაში არის ცნობები რამდენიმე კვლევის შესახებ, რომლებიც აღწერენ, რომ ანაერობულ პირობებში ხდება ბაცილის ზრდა, მაგრამ სპორულაციის ეფექტიანობა მკვეთრად მცირდება. გარდა ამისა, სპორების ფორმირება დამოკიდებულია საკვები არის შემადგენლობაზე. მაგალითად, ანაერობიოზში, MOD საკვები არე გლუკოზის კონცენტრაციით 5.4 გ/ლ და მიკროელემენტების გარეშე განაპირობებდა *B. cereus*-ის შტამების ანაერობულ ზრდას, მაგრამ სპორების ფორმირება არ იყო გამოვლენილი (Abbas et al., 2014). იგივე ბაცილის ჰქონდა სპორულაციის შესაძლებლობა მოდიფიცირებულ 1.8 გ/ლ გლუკოზის შემცველ MOD საკვები არეზე და Ca, Mn, Zn, Fe-ის დამატებისას, თუმცა სპორულაცია იყო უფრო დაბალი, ვიდრე აერობულ პირობებში.

2.8. მიკროელემენტების გავლენა

ინფორმაცია ბაცილის ზრდასა და სპორულაციაზე მიკროელემენტების ზეგავლენის შესახებ ძალიან მწირია. ისეთი ელემენტები, როგორიცაა Ca, Mn, Mg, Fe და Zn შესაბამისი კონცენტრაციებით აუცილებელია სპორულაციისთვის, რადგან ისინი

არსებობენ სპორების ფენებში და საშუალებას აძლევენ მათ წინააღმდეგობა გაუწიონ მაღალ ტემპერატურას, ხოლო Fe და Zn აჩქარებენ სპორულაციის პროცესს (Hageman et al., 1984; Tzeng et al., 2008). ზემოაღნიშნულიდან გამომდინარე, *B. cereus*-ის შტამებს აღმოაჩნდათ სპორულაციის შესაძლებლობები ანაერობიოზის დროს, მოდიფიცირებულ MODS- საკვებ არეში, 1.8 გ/ლ გლუკოზის შემცველობისას და Ca, Mn, Zn, Fe - ს დამატებისას (Abbas et al., 2014). ოჰარამ და ჰაგემანმა (O'Hara and Hageman, 1990) აჩვენეს, რომ სპორულაციისთვის ქიმიურად განსაზღვრულ საკვებ არეში *B. subtilis*-ის უჯრედები ძლიერ არიან დამოკიდებული საკვებ არეში კალციუმის იონების დამატებაზე, მაქსიმალური სპორულაციის მისაღწევად. მონტეირომ და სხვებმა (Monteiro et al., 2005) აჩვენეს, რომ *B. subtilis* 210-ის შტამი უჯრედები ასევე, ძლიერ არიან დამოკიდებული კალციუმის იონების დამატებაზე საკვებ არეში მაქსიმალური სპორულაციის მისაღწევად. მათ შეისწავლეს კალციუმის იონების კონცენტრაცია 0.4-დან 1.2 გ/ლ-მდე დიაპაზონში და აღმოჩნდა, რომ კალციუმის კონცენტრაციის 0.6 გ/ლ-მდე გაზრდამ გამოიწვია სპორების პროდუცირების გაზრდა. აღსანიშნავია, რომ DPA-ს Ca^{2+} ხელატი წარმოადგენს სპორის არააქტიური ბირთვის ძირითად კომპონენტს, რაზეც სპორების მთელი მასის 10% მოდის (Slieman and Nicholson, 2001). ბოლო დროს პოსადა-ურიბემ და სხვებმა (Posada-Uribe et al., 2015) დაადგინეს, რომ *B. subtilis* წარმოქმნის სპორებს საკვებ არეში, რომელიც შეიცავს $MnCl_2$-ს ან არ შეიცავს, თუმცა საკვები არეები რომლებიც შეიცავენ ამ მარილს ყველაზე მაღალი კონცენტრაციით (0.5 გ/ლ), აქვთ სპორულაციის ყველაზე უკეთესი ეფექტიანობა. და ბოლოს, ექვსი მეტალის იონიდან, ოთხმა იონმა Mn^{2+}, Fe^{2+}, Ca^{2+} და Mg^{2+} აჩვენა მნიშვნელოვნად დადებითი გავლენა *B. amyloliquefaciens* BS-20-ის სპორულაციის გაუმჯობესებაზე, საკონტროლო საკვებ არესთან შედარებით, მაგრამ თუთიის ჩართვას, სპორულაციაზე, ჰქონდა უარყოფითი შედეგი (Ren et al., 2018). მეტალის იონების კონცენტრაცია იყო 1.0 მილიმოლი Mn^{2+}, 3.0 მილიმოლი Fe^{2+}, Ca^{2+} 2.0 მილიმოლი და Mg^{2+} მილიმოლი. ოპტიმალური კონცენტრაციებით Mn^{2+}, Fe^{2+} და Ca^{2+} ის კომბინირებულმა გამოყენებამ კულტურის საკვებ არეში გამოიწვია სპორების გამოსავლიანობის 3.4-ჯერ გაზრდა. გაანალიზეს რა მიღებული შედეგები, ავტორებმა ივარაუდეს, რომ სხვადასხვა შტამებს შეიძლება ჰქონდეთ სხვადასხვა რეაგირება საკვებ არეში არსებული მეტალების იონებზე და მნიშვნელოვანია, სკრინინგის

დეტალური პროცედურების გამოყენება მეტალების იონების კონცენტრაციის ოპტიმიზაციამდე.

2.9. კულტივირების მეთოდების გავლენა

მასიური წარმოება წარმოადგენს პრობიოტიკული პროდუქტის კომერციული განვითარებისთვის ერთ-ერთ მნიშვნელოვან ასპექტს. პრობიოტიკების წარმოების ღირებულება ასევე მნიშვნელოვნადაა დამოკიდებული ფერმენტაციის მეთოდებზე. დღეს, მრეწველობაში სიღრმულ ფერმენტაციას უფრო ხშირად იყენებენ, როგორც მოკლე და ადვილად ავტომატიზირებად პროცესს. თუმცა,ზოგიერთი კვლევის თანახმად, მყარი სუბსტრატების ფერმენტაციით (SSF) პრობიოტიკების წარმოება ეფექტიანი ღირებულებისა და გარემოსადმი მეგობრული მეთოდია (El-blendary, 2006; Shim et al., 2010). სიღრმულ ფერმენტაციასთან მყარფაზოვანი ფერმენტაციის პოტენციალის უპირატესობას წარმოადგენს შედარებით მარტივი ტექნიკური აღჭურვილობა და იაფი ინვესტიციები, აგრეთვე, ბიოტექნოლოგიური თვალსაზრისით, ზოგიერთი ბიოტექნოლოგიური უპირატესობა, როგორიცაა მაღალი ფერმენტული აქტივობა, პროდუქტების მაღალი საბოლოო კონცენტრაცია და სტაბილურობა, დაბალი კატაბოლიტური რეპრესია, მიკროორგანიზმების კულტივირება წყალში უხსნად სუბსტრატებზე და დაბალი მოთხოვნილება სტერილიზაციაზე (Badu, Satyanarayana, 1995; Holker et al., 2004). მყარფაზოვანი ფერმენტაციის შემდგომ, ლიოფილიზაცია შესაძლებელია ცენტრიფუგირების გარეშე. თუმცა, ბაქტერიის მყარფაზოვანი კულტივირების გამოყენებისას, არსებობს ზოგიერთი ტექნოლოგიური თავისებურებები, რომლებიც დაკავშირებულია აერობული მეტაბოლიზმის დროს ჟანგბადის მოხმარებასთან, CO_2-ის გამოდევნასთან, მეტაბოლიზმის განმავლობაში წარმოქმნილ სითბოსთან და აქროლად კომპონენტებთან. ასევე, მნიშვნელოვანი ფაქტორია სუბსტრატის ტენიანობა, რადგან ბაქტერიისთვის ტენის მაღალი შემცველობა ზრდის შესაფერისი პირობაა.

ორივე, სიღრმული და მყარფაზოვანი ფერმენტაცია ფართოდ გამოიყენება პრობიოტიკების წარმოებისთვის, თუმცა წინა კვლევებში ნაკლებადაა შედარებითი ინფორმაცია *Bacillus* spp.-ს სიღრმული და მყარფაზოვანი ფერმენტაციის შესახებ.

Lactobacillus reuteri G8-5-ის და *B. subtilis* MA139-ის მულტიმიკრობული პრობიოტიკის მყარფაზოვანი ფერმენტაციით დასამზადებლად, სანჯღრეველაზე გაზრდილ კულტურაში, ოპტიმიზებულ იქნა რიგი პარამეტრები შემადგენლობით - ცხოველის საკვებად განკუთვნილი დაფქვილი სოია, სიმინდის ფქვილი და ხორბლის ქატო, პროპორციით 1:1:2 (Zhang et al., 2014). ოპტიმიზაციის პროცესი მიმდინარეობდა შემდეგნაირად: წყლის შემცველობა - 50%; საწყისი pH – 6.5; ინოკულატის რაოდენობა - 2%; 250 მლ-იან კოლბაში მშრალი ნივთიერება - 30 ~ 35 გ რაოდენობით სტერილიზაციის გარეშე და ფერმენტაციის დრო 2 დღე. მულტიმიკრობულმა პრეპარირებამ განაპირობა მაქსიმალური კონცენტრაცია *Lactobacillus*-სთვის 9.01 log კწე/გ და *Bacillus*-ის სპორები 10.30 log კწე/გ-ში. უფრო მეტიც, *L. euteri* G8-5-ს სიცოცხლისუნარიანობა მნიშვნელოვნად გაიზარდა *B. subtilis* MA139-ს თანაობისას, რამაც გააუმჯობესა ცხოველთა საკვებდანამატად განკუთვნილი პრობიოტიკების წარმადობა.

იანგმა და სხვებმა (Ying et al., 2009) მოახდინეს *B. subtilis* MA139, *Lactobacillus fermentum* და *S. cerevisae*-ის თანაკულტივირება არასტერილურ სუბსტრატში (ცხოველთა საკვებად განკუთვნილი დაფქვილი სოია და ხორბლის ქატო). საფერმენტაციო პარკში ბაქტერიასთან ერთდროულად ინოკულირებული იქნა *S. cerevisae* ჟანგბადის მოხმარებისათვის, რათა *Lactobacillus*-ს მისცემოდა ზრდის საშუალება. ენტერობაქტერიების ზრდა ეფექტიანად იქნა ინჰიბირებული და 4 დღიანი ფერმენტაციის შემდეგ ეს შტამები ვეღარ იქნა ნაპოვნი. სასტარტო შტამების რაოდენობა სწრაფად იზრდებოდა პირველი 2 დღის განმავლობაში. საფუარის უჯრედების რაოდენობა (7.71 log კწე/გ) აღმოჩენილ იქნა ფერმენტაციის მე-3 – 4 დღეს და ოდნავ შემცირდა მე-5 – 10 დღეს. *Bacillus*-ის რაოდენობამ მაქსიმუმს (8.68 log კწე/გ) მიაღწია მე-3 დღეს. *L. fermentum*-ის მაქსიმალური რაოდენობა (9.04 log კწე/გ) აღმოჩნდა სუბსტრატში და მათმა ზრდამ სტაბილურ დონეს მიაღწია მე-5 დღიდან. ავტორებმა დაადგინეს, რომ *B. subtilis* MA139-ის ანტიმიკრობული სუბსტანციების წარმოების გამო, პრობიოტიკული მიკროორგანიზმები წარმატებით აკონტროლებდნენ ენტერობაქტერიების ზრდას (რამდენადაც, *Escherichia coli* K88 და *Salmonella typhimurium* არ იქნა აღმოჩენილი) და ამიტომ წარმოადგენდნენ იოლ და იაფ გზას მყარფაზოვანი ფერმენტაციისთვის, ცხოველის საკვების საწარმოებლად.

2.10. *Bacillus* spp. პრობიოტიკის წარმოების მასშტაბირება ლაბორატორიულ ფერმენტიორში

მასშტაბირება წარმოადგენს მნიშვნელოვან ეტაპს პრობიოტიკების წარმოების პროცესის გასაუმჯობესებლად. საკვები არის ოპტიმიზაციის შემდეგ, სანჯღრეველაზე ექსპერიმენტისას, უნდა დადასტურდეს *Bacillus* spp.-ს სპორების მსხვილმასშტაბიანი პროდუცირების ტექნიკური განხორციელებადობა და უნდა განისაზღვროს კულტივირების ოპტიმალური პირობები, რომლებიც ასტიმულირებენ ბაცილის აქტიურ ზრდას და სპორულაციას.

პრობიოტიკების წარმოებისათვის, დასმა და სხვებმა (Das et al. 2010) შეარჩიეს *Bacillus coagulans* RK-02, რადგან მას გააჩნია უპირატესობა ფარმაცევტული ინდუსტრიისთვის და ასევე, გააჩნია უნიკალური თვისებები, კერძოდ: ის არის რძის მჟავის მაპროდუცირებელი სპოროგენული ბაქტერია, მისი შენახვა შესაძლებელია ოთახის ტემპერატურაზე და ამიტომ, უფრო ადვილია მისი შენახვა გადამუშავებისა და შეფუთვის სხვადასხვა ეტაპზე. მას შეუძლია გამოიმუშაოს რიგი ინდუსტრიულად მნიშვნელოვანი, უჯრედგარე ფერმენტები. მკვლევარებმა მაქსიმალური შედეგის მისაღწევად გამოიყენეს საინტერესო სტრატეგია ერთი და იგივე ტექნოლოგიურ პროცესში სამი განსხვავებული პირობის შენარჩუნებით მაქსიმალური ბიომასის, ლიპაზისა და სპორების კონცენტრაციის მისაღებად. დასაწყისში, 9 საათის განმავლობაში შენარჩუნებული იყო 36.86^{o}C ტემპერატურა, 237 ბრუნი/წთ მორევის სიჩქარე და 150 ლ/სთ აერაცია, გლუკოზის გამოყენებამდე. აქაფების საწინააღმდეგო აგენტად გამოყენებული ზეთი დაემატა 0.05% საწყისი კონცენტრაციით, ისე, რომ ბაქტერიებს შეძლებოდათ ამ განსხვავებულ საკვებ არესთან ადაპტაცია და თითოეული უჯრედისთვის ხელმისაწვდომი ყოფილიყო მეტი ჟანგბადი. აღმოჩნდა, რომ რომ გლუკოზის მოხმარება ხდებოდა კულტივირების პირველ 9 საათში, ამიტომ ლოგარითმული ფაზის დასასრულამდე (ანუ, 6 საათის შემდეგ), ვიდრე გლუკოზის კონცენტრაცია იყო 6 გ/ლ-ზე ოდნავ ნაკლები, დაემატა დანარჩენი 9 მლ ზეთი. მეცხრე საათიდან ოცდამეორე საათამდე, 35.2^{o}C ტემპერატურაზე, 213 ბრუნი/წუთში მორევის სიჩქარესა და 220 ლ/სთ აერაციისას შენარჩუნდა ლიპაზას მაქსიმალური პროდუცირება. ასე, რომ 40.85^{o}C ტემპერატურის, 158.4 ბრუნი/წუთში მორევის

სიჩქარე და 106 ლ/სთ აერაცია შენარჩუნებულ იქნა პროცესის ბოლომდე, საკვებ არეში სპორების ფორმაციის დონის მაქსიმალიზაციისთვის. ამ სტრატეგიის თანახმად, ბიომასის გამოსავლიანობა, სპორულაცია და ლიპაზური აქტივობა მრავალჯერ გაუმჯობესდა. 36 საათიანი ფერმენტაციის შემდგომ, ბიომასის კონცენტრაციის შესაბამისი მნიშვნელობა, ლიპაზური აქტივობა და სპორების გამოსავლიანობა იყო 6.19 გ/ლ, 9.1 ერთეული და 6×10^{12} ბიომასის 1 გრამზე, შესაბამისად.

სხვა კვლევების თანახმად, სენის და სხვების მიერ (Sen et al., 2005) ჩატარებულ იქნა სრული 24 ფაქტორიანი მათემატიკური მეთოდით (central composite design) კვლევა, რასაც თან სდევდა მრავალეტაპიანი მონტე კარლო პროცესის ოპტიმიზაცია *Bacillus coagulans* RK-02-ის კულტივირებისა და სპორულაციისთვის. მათ დაადგინეს პროცესის ოპტიმალური პირობები ბიომასის მაქსიმალური პროდუქტიულობისთვის, კერძოდ: pH–6.65; ტემპერატურა – 38.3°C; მორევის სიჩქარე – 247 ბრუნი/წუთში, აერაცია – 1.05 ლ/ლ/წთ და მაქსიმალური სპორულაციისთვის: pH–6.27; ტემპერატურა – 41.4°C; მორევის სიჩქარ – 115 ბრუნი/წუთში და აერაცია – 0.33 ლ/ლ/წთ. აქედან გამომდინარე, განისაზღვრა ორეტაპიანი სტრატეგია, პირველ ეტაპზე, ექსპონენციურ ფაზაში, ზრდის ოპტიმალურ პირობებში, ბიომასის პროდუცირებასთან დაკავშირებით, ხოლო მომდევნო, მეორე ეტაპზე სტაციონარულ ფაზაში შემუშავდა სპორულაციის ოპტიმალური პირობები იმგვარად, რომ მიღებულ იქნა პრობიოტიკული ბიომასის მაქსიმალური გამოსავლიანობა 4.3 გ/ლ და სპორების გამოსავლიანობა 9×10^{11} სპორა/გრ მშრალ ბიომასაზე, ეფექტიანი ნუტრიცევტიკების ფორმულაციისთვის.

მორევის უპირატესობა მდგომარეობს მიკროორგანიზმების ზრდისთვის საჭირო საკვების ინგრედიენტების და ჟანგბადის უმჯობეს მიწოდებაში. სპორების მაქსიმალურ პროდუქტიულობას ხელი შეუწყო მორევის გარკვეულმა სიჩქარეებმა. მორევის სიჩქარე 200 ბრუნი/წთ-ში აღმოჩნდა საუკეთესო *B. amyloliquefaciens* B128-ის სპორების მაქსიმალური ოდენობით პროდუცირებისთვის, 5 ლიტრი ტევადობის მომრევ ბიორეაქტორში (Tzeng et al., 2008). ამისგან განსხვავებით, მონტეირომ და სხვებმა (Monteiro et al., 2014) განახორციელეს *B. subtilis*-ის კულტივირება 2 ლიტრი ტევადობის ბიორეაქტორში, ქიმიურად განსაზღვრულ, ოპტიმიზებულ საკვებ არეში და ზრდის ექსპონენციური ფაზის განმავლობაში მორევის სიჩქარე გაზარდეს 100-

დან 1200 ბრუნ/წუთამდე, ჟანგბადის მოხმარების საკომპენსაციოდ. ვეგეტატური უჯრედების კონცენტრაცია (1.3×10^{10} უჯრედი/მლ) მიღებული იქნა ექსპონენციური ფაზის ბოლოს, მაგრამ ამის შემდეგ გამოვლინდა მაღალი უჯრედული ლიზისი და ვეგეტატური უჯრედების მხოლოდ 48%-მა წარმოქმნა თბორეზისტენტული სპორები, საბოლოო კონცენტრაციით 6.3×10^{9} სპორა/მლ.

პანდეიმ და ვაკილმა (Pandey and Vakil, 2016) დიდი რაოდენობით ბიომასის მისაღებად ჩაატარეს მაღალი უჯრედული სიმჭიდროვის ფერმენტაცია. მაღალი უჯრედული სიმჭიდროვით კულტივირების მეთოდი (HCDC) საშუალებას იძლევა მიღებული იქნეს გაცილებით დიდი რაოდენობით ბიომასა კულტივირების პროცესში (20 - 200 გ მშრალი უჯრედული მასა/ლ), რასაც შეუძლია გამოიწვიოს პროდუქტის უფრო მაღალი კონცენტრაცია. pH-ის რეგულირების გარეშე კულტივირებისას, C/N 35:1, გამოსავლიანობა იყო 21 გ/ლ (რაც შეესაბამება 2.9×10^{11} უჯრედს), რაც უფრო მაღალი იყო, ვიდრე ოპტიმიზებულ, სანჯღრეველას პირობებში მიღებული ბიომასა (8.0 გ/ლ). შემდეგ, ჩატარდა fed-batch მეთოდით ფერმენტაცია (38 სთ), სადაც გლუკოზა ემატებოდა პერიოდულად (დაახლოებით 50 მლ გლუკოზის კონცენტრაციის 250 გ/ლ), pH არ კონტროლდებოდა და შენარჩუნებული იყო C/N თანაფარდობა 35:1. მიღწეულ იქნა გამოსავლიანობა 25 გ/ლ (შეესაბამება 3.2×10^{11} უჯრედი/მლ), რაც 20%-ით უფრო მაღალი იყო, ვიდრე პერიოდული კულტივირებისას. საუკეთესო შედეგი მიღებული იქნა B4 პროცესში, სადაც გამოსავლიანობა იყო 30 გ/ლ ბიომასაზე, რაც შეესაბამება 3.8×10^{11} უჯრედს მლ – ში, პარალელურად სპორების მაღალ ტიტრთან – 1.9×10^{11} მლ და სპორულაციის ეფექტიანობასთან - 81% ერთად. ბიომასის მაღალი წარმადობა მიღწეულ იქნა მიკრორგანიზმის ჟანგბადით მაქსიმალურად დაკმაყოფილებით, შენარჩუნდა რა DO-ს კონცენტრაცია კრიტიკულ დონეზე მაღლა (20% DO). კულტივირების ყველა პროცესში საწყისი pH შემცირდა 6.5-დან 4-მდე, ხოლო გვიან ეტაპებზე ისევ შეიცვალა 4-დან 6-6.5-მდე. pH-ის შემცირება საწყის ეტაპზე, სავარაუდოდ დაკავშირებული იყო გლუკოზის რძის მჟავად გარდაქმნასთან. მოგვიანებით ეტაპზე, როდესაც გლუკოზა თითქმის სრულად იქნა მოხმარებული, უჯრედებმა დაიწყეს ლაქტატის მეტაბოლიზება.

აღწერილი იყო ვეგეტატური უჯრედების მაღალი გამოსავლიანობის მისაღებად შემუშავებული პერსპექტიული მეთოდი (Kulpreecha et al., 2009). ლიტერატურაში მოყვანილი ფართო სპექტრის შედეგების თანახმად, სპორების კონცენტრაცია ძირითადად დამოკიდებულია გამოყენებულ შტამებზე. Fed-batch კულტურა კონტროლირებად 7.0 pH-თან, 60 % აირის სატურაციასთან, მიკროელემენტებთან, შაქრის მაღალ კონცენტრაციასთან (400 გ/ლ შაქრის ლერწამი) და მოლარული თანაფარდობა (40 გ/ლ შარდოვანა) კოეფიციენტით 10 C/N-თან ერთად, *B. megaterium* BA-019-ის pH-stat (სტაბილური pH) fed-batch კულტივირებისას უჯრედების რაოდენობა მნიშვნელოვნად გაიზარდა (72.6 გ/ლ). უნდა აღინიშნოს, რომ კულტივირების ამ გზით მიღებული უჯრედების დიდი რაოდენობის გამო, DO სწრაფად მცირდებოდა 0%-მდე და სავარაუდოდ, 24 საათის შემდეგ გამოიწვია მათი ზრდის შეჩერება ანუ შეიქმნა სპორაწარმოქმნისთვის ხელსაყრელი პირობები. თუმცა, ამ კვლევებში სპორების რაოდენობის შესახებ მონაცემები არ იყო მოყვანილი.

1 ცხრილში მოცემული შედეგები ცხადყოფენ batch და fed-batch ფერმენტაციისას სხვადასხვა სპორაწარმომქმნელი პრობიოტიკების პროდუცირებისთვის გამოყენებული საკვები არეების მრავალფეროვნებას. ლუნამ და სხვებმა (Luna et al., 2002) გამოიყენეს მარტივი, მელასაშემცველი საკვები არე *B. subtilis* R14-ის კულტივირებისთვის, გამოსავლიანობა – 1.0 x 10^9 სპორა/მლ. მონტეირომ და სხვებმა (Monteiro et al., 2005; 2014) წარმატებით შეძლეს საკვებ არეში მარილების მიქსტურის დამატების გზით განსაკუთრებით მაღალი ბიომასური გამოსავლიანობის მიღება, მაშინ, როდესაც პანდეიმ და ვაკილმა (Pandey and Vakil, 2016) ეს შეძლეს კულტივირების პირობების შექმნის გზით. თუმცა, აღსანიშნავია, რომ ბაქტერიის ზრდის სუბსტრატად ლიგნოცელულოზური ნედლეულის გამოყენების შესახებ კვლევების რაოდენობა საკმაოდ შეზღუდულია.

ცხრილი 1. პრობიოტიკების სპორაწარმოება batch და fed-batch ფერმენტაციის დროს

ბაქტერიის სახეობა	ბიორეაქტორი, საკვები არის შემადგენლობა	სპორების კონცენტრაცია/მლ	ავტორები
B. subtilis R14	5 ლ batch ბიორეაქტორი, (გ/ლ): მელასა - 20.0, საფუარის ექსტრაქტი - 9.2, KH_2PO_4 - 1.0	1.0×10^9	Luna et al., 2002
B. subtilis MB24	2 ლ ტევადობის fed-batch ბიორეაქტორი, (გ/ლ): ბაქტო ნუტრიენტ საფუარი – 120, KCl - 1, $MgSO_4$ - 7.7, გლუკოზა - 52.5, 15 მლ ხსნარი შემცველობით 1 მოლი $Ca(NO_3)_2$, 10 მილიმოლი $MnCl_2$, 1 mM $FeSO_4$.	7.4×10^9	Monteiro et al., 2005
B. subtilis EA-CB0575	14 ლ ტევადობის ბიორეაქტორი, (გ/ლ): გლუკოზა - 1.04, საფუარის ექსტრაქტი - 5.0, მინერალური მარილები	8.8×10^9	Posada-Uribe et al., 2015
B. subtilis WHKZ12	30 ლ ტევადობის ფერმენტიორი, შიგთავსის შემდეგი შემცველობით: სიმინდის სახამებელი, ხორბლის ქატო, სიმინდის ფქვილი, სიმინდის ექსტრქტი, სოიას ფქვილი და საფუარის ექსტრაქტი	1.56×10^{10}	Chen et al., 2010

ცხრილი 1. გაგრძელება

B. subtilis 210	2 ლ ტევადობის fed-batch კულტივირება 400 გ/ლ გლუკოზის ხსნარისა და 120 გ/ლ ამონიუმის სულფატის ხსნარის გამოყენებით. საკვები არე შეიცავდა მარილებისა და ვიტამინების კომპლექსს.	3.6×10^{10}	Monteiro et al., 2014
B. coagulans	6.6 ლ batch ბიორეაქტორი, (გ/ლ): სიმინდის ექსტრაქტი - 15, დექსტროზა - 3, პეპტონი - 0.5, $CaCl_2$ x $2H_20$ -0.37 $MnSO_4$ x $7H_2O$ - 0.27; გლუკოზა - 50 მლ 250 გ/ლ კონცენტრაციით.	1.9×10^{11}	Pandey, Vakil, 2016
B.coagulans RK02	Benchtop ფერმენტიორი, (გ/ლ): პეპტონი -10, ზეთი - 0.5, NH_4NO_3 - 0.22, მინერალური მარილები.	6.0×10^{12}	Das et al., 2010

2.11. ***Bacillus***-ის პრობიოტიკების გამოყენება

სამომხმარებლო მოთხოვნილება ნატურალურ და ორგანულ სურსათზე მუდმივად იზრდება. შესაბამისად, იზრდება მოთხოვნილება ტექნოლოგიებზე, სასოფლო-სამეურნეო ცხოველების პროდუქტიულობის ზრდასა და ორგანული და ნატურალური პროდუქტების წარმოების გაფართოებაზე. ერთ-ერთი ასეთი ტექნოლოგია, რომელსაც მნიშვნელოვანი ყურადღება ექცევა, არის ცხოველთა საკვებში ცოცხალი, სასარგებლო ბაქტერიების-პრობიოტიკების გამოყენება. რამდენიმე უნიკალური თვისების გამო, მათ შორის, სურსათისა და ფარმაცევტული პრეპარატების წარმოებისა და შენახვის პერიოდში სტაბილურობის ჩათვლით,

ბაცილი წარმოადგენს მეტად სასარგებლო ინგრედიენტს ჯანმრთელობის მდგომარეობის გასაუმჯობესებლად. სწორედ ამიტომ ხდება სამედიცინო დანიშნულების დანამატების სახით *Bacillus*-ის შტამებისგან პრობიოტიკების წარმოების კომერციალიზაცია.

აღმოჩნდა, რომ *Bacillus*-ის სახეობების ფართო სპექტრი კავშირშია სოიას, სიმინდის, ბრინჯის და სხვა ბევრი სუბსტრატის ბუნებრივ ფერმენტაციასთან. მაგალითად, Natto (იაპონია), Gari (აფრიკა), Douchi (ჩინეთი), Rabadi (ინდოეთი, პაკისტანი), Soibum (ინდოეთი), Ugba (ნიგერია) და ა.შ. არიან იმ პოპულარულ ფუნქციურ სურსათს შორის, რომლებიც წარმოადგენენ *Bacillus* spp-სა და რძემჟავა ბაქტერიის ბუნებრივ ნარევს. ეს ფერმენტირებული პროდუქტები ავლენენ უნიკალურ სენსორულ თვისებებს, სავარაუდოდ *Bacillus* spp.-ს მიერ გამომუშავებული უჯრედგარე ნახშირწყლებისა და ცილების მადეგრადირებელი ფერმენტების აქტივობის გამო. ამჟამად, *Bacillus*-ის შტამები ძირითადად გამოიყენება როგორც ალტერნატიული, უსაფრთხო და ეკონომიკურად ეფექტიანი აგენტები, დამცავი და თერაპიული ეფექტისთვის, ზოგიერთი სისტემური კლინიკური სინდრომის, კერძოდ, მეტაბოლური დარღვევების საწინააღდეგოდ. გარდა ამისა, დადგენილია, რომ *Bacillus*-ის შტამების პრობიოტიკების გამოყენებისას დისბაქტერიოზებისა და ნაწლავების ანთების დროს მდგომარეობა უმჯობესდება (Elshaghabee et al., 2017). *B. subtilis* CSY191-ის სურფაქტინის მსგავს ნაერთს შესწევს უნარი შეაჩეროს ადამიანის მკერდის სიმსივნის გამომწვევი MCF-7-ის უჯრედების ზრდა, დოზა - დამოკიდებულების გზით (Lee et al., 2012). *B. licheniformis*-თან ერთად ფერმენტირებული სოიას პასტით ცამეტკვირიანმა დიეტურმა ინტერვენციამ ხელი შეუშალა გაცხიმოვნებას, რომელიც დაკავშირებული იყო C57BL/6J თაგვების გაცხიმოვნებით გამოწვეული დიეტის პარამეტრებთან (Choi et al., 2016). ფერმენტირებული სოიით გამოკვებილ ჯგუფზე დაკვირვებამ ცხიმის მაღალი შემცველობის მქონე საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით, გამოავლინა სისხლში გლუკოზის, ინსულინის, შრატისა და ჰეპატოლიპიდების შედარებით დაბალი შემცველობა და სხეულის დაბალი წონა. *B. subtilis*-დან მიღებულმა ეგზოპოლისაქარიდმა დათრგუნა კარდიოვასკულარული დაავადება, რაც

დაკავშირებული იყო ვირთაგვებში სტრეპტოზოცინით გამოწვეულ დიაბეტთან (Ghoneim et al., 2016).

სპოროვანი პრობიოტიკები ფართოდ გამოიყენება ადამიანებისთვის განკუთვნილ დიეტურ სასურსათო დანამატად, ცხოველებსა და აკვაკულტურებში ზრდის სტიმულატორად და დაავადებების საწინააღმდეგოდ.

ცხრილი 2. *Bacillus*-ის სპორების შემცველი კომერციული დანიშნულების პრობიოტიკული პრეპარატები

პროდუქტი	მწარმოებელი	გამოყენება/კომენტარები
ადამიანის მოხმარებისთვის განკუთვნილი პრობიოტიკები		
Bactisubtil	Marion Merrell (Levallois-Perret, France), Casella-Med, Cologne, Germany	კაფსულა შეიცავს *Bacillus cereus*-ის შტამი IP5832b (ATCC 14893)-ის 1 x 10^9 სპორას.
Biosporin	Biofarm, Dniepropetrovsk, Ukraine	ბიოსპორინი წარმოადგენს ცოცხალი, ანტაგონისტური ბაქტერიის *B. subtilis* და *B. licheniformis* ორი შტამის მიქსტურას(თანაფარდობა3:1).
Bispan	Binex Co. Ltd., Busan, S. Korea www.bi-nex.com	აბს გადააქვს *B. polyfermenticus*-ის სპორები (1.7 x 10^7).
Flora-Balance	Flora-Balance, Montana, USA www.flora-balance.com	კაფსულას გადააქვს *Bacillus laterosporus* BODc, მაგრამ შეიცავს *Brevobacillus laterosporus* BOD-ს.
Medilac-Vita	Hanmi Pharmaceutical Co. Ltd., Beijing, China; http://www.hanmi.co.kr	*B. subtilis* (10^8 გ/ლ-დან) *Enterococcus faecium* -თან კომბინაციით.
Primal Defense	Garden of Life, Palm Beach, Florida, USA. www.gardenoflife.com/	*B. subtilis*.

ცხრილი 2. გაგრძელება

მეცხოველეობაში გამოსაყენებელი პრობიოტიკები		
BioGrow	Provita Eurotech Ltd., Omagh, Northern Ireland, UK http://www.provita.co.uk	მეფრინველეობა, ხბოები და მეღორეობა. შეიცავს *B. licheniformis* -სა (1.6 x 10^9 გ/ლ) და *B. subtilis* - ის (1.6 x 10^9 გ/ლ) სპორებს.
BioPlus 2B	Christian Hansen Hoersholm, Denmark. http://www.chbiosystems.com	გოჭების, ქათმების, ინდაურების გამოსაკვებად. *B. licheniformis* and *B. subtilis* - ის მიქსტურა (1/1) 1.6 x 10^9 გ/ლ-დან თითოეული ბაქტერია.
Neoferm BS 10	Sanofi Sante Nutrition Animale, France	ფრინველები, ხბოები და ღორები. *B. clausii*-ის 2 შტამი.
Toyocerin	Asahi Vet S.A., Tokyo (Head Off.), Japan. http://www.asahi-kasei.co.jp	ხბოები, ფრინველები, ბოცვრები და ღორები. შესაძლებელია გამოყენებულ იქნას აკვაკულტურებისთვის. *B. cereus var. toyoi* -ს მინიმალური კონცენტრაციიდან 1 x 10^{10} გ/ლ სიმინდის ფქვილთან (წონის 4%) და კალციუმის კარბონატთან (წონის 90%) ერთად.

მე-2 ცხრილში ნაჩვენები რამდენიმე პრობიოტიკული პრეპარატი შეიცავს ერთზე მეტ შტამს. სანდერსმა და ველდმა (Sanders and Veld, 1999) ივარაუდეს, რომ პრობიოტიკებით განპირობებული ჯანმრთელობის ეფექტი დამოკიდებულია მიკროორგანიზმის გვარზე, სახეობასა და სპეციფიურ შტამზე და მათ მიერ რეკომენდებული იქნა, რომ მულტიშტამური და მულტისახეობრივი პრობიოტიკები უფრო ეფექტიანები არიან, ვიდრე მონოშტამური პრობიოტიკები. რიგი კვლევები ადასტურებენ პრობიოტიკების სასარგებლო გავლენას ზრდაზე, ნუტრიენტების შენარჩუნებაზე, საჭმლის მომნელებელი სისტემის ჯანმრთელობასა და

მიკროფლორაზე (Musa et al., 2009; Mountzouris et al., 2010; Shim et al., 2010). თუმცა, პრობიოტიკების ეფექტიანობა დამოკიდებულია მთელ რიგ ფაქტორებზე, კერძოდ, ბაქტერიულ შტამზე და ტემპერატურის მიმართ მედეგობაზე, სიცოცხლისუნარიანობაზე გრძელვადიანი შენახვის პირობებში, დოზაზე და გამოყენების მეთოდზე.

2.12. პრობიოტიკების გამოყენება მეცხოველეობაში

იმის გათვალისწინებით, რომ ბაქტერიული სპორები მეტაბოლიტურად არ არიან აქტიურები, განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია იმის გარკვევა, შეუძლიათ თუ არა მათ ცხოველის გასტროინტესტინალურ ტრაქტში (GI) ზრდა-განვითარება. ადრეული კვლევების თანახმად, მასპინძელი ცხოველების შესწავლილისას ივარაუდეს, რომ ბაქტერიის სპორებს აქვთ უნარი გაიზარდონ ძაღლების, ბოცვრების, თაგვების, ღორებისა და ქათმების გასტროინტესტინალურ ტრაქტში (Leser et al., 2007; Cutting, 2011). მნიშვნელოვანია პრობიოტიკების გამოყენების ეკონომიკური შედეგების გათვალისწინება. ჯინის და სხვების მიერ (Jin et al., 2000) დადგენილ იქნა პრობიოტიკების გამოყენებაზე დოზა-დამოკიდებული რეაქცია. ავტორების მიერ აღწერილი იქნა, რომ ფრინველები რომლებიც იღებდნენ 0.10% *Lactobacillus*-ის კულტურას, სიკვდილიანობა შემცირდა 8,2%-დან 3,2-% მდე. პრობიოტიკული შტამები ცალ-ცალკე და კომბინაციაში მნიშვნელოვნად აუმჯობესებენ ცხოველის საკვების შეწოვას, ცხოველის საკვების კონვერსიის დონეს (FCR), ყოველდღიურ წონამატს და სხეულის საერთო წონას ქათმებში, ღორებში, ცხვრებში, თხებში, მსხვილფეხა ცხოველებსა და ცხენებში (Bohmer et al., 2006; Musa et al., 2009) ასევე, სასარგებლო ეფექტი ჰქონდა რძის პროდუქტიულობის მომატებაზე, ცხიმებისა და ცილების შემცველობაზე (Kritas et al., 2006).

2.13. პრობიოტიკების გამოყენება მეღორეობაში

მეღორეობაში პრობიოტიკების გამოყენება დაკავშირებული იყო საჭმლის მონელების

დისბალანსით გამოწვეულ პათოლოგიურ გარემოებებთან ბრძოლასა და მათ შემცირებასთან. რამდენიმე კვლევაში აღწერილია მონაცემები ღორებში პათოგენების კოლონიზაციის კონტროლისა და მათი შემცირების მიზნით პრობიოტიკული კულტურების ეფექტიანი გამოყენების შესახებ. ადრეულმა კვლევებმა აჩვენა, რომ პრობიოტიკების გამოყენებამ გამოიწვია დაავადებებისადმი რეზისტენტობის გაუმჯობესება და ალერგიების რისკის შემცირება; ღორის ორგანიზმში ისინი ასტიმულირებენ საპასუხო იმუნურ რეაქციებს და აძლიერებენ დაცვის იმუნურ სისტემას (Ceslovas et al., 2005). ლიმ და სხვებმა (Lee et al., 2014) გამოიყენეს ციტრუსების წვენის საწარმოო ნარჩენების მყარფაზოვანი ფერმენტაციის პირობებში წარმოებული B. *subtilis* LS 1–2 (BS 1–2). BS 1–2-ის ფერმენტირებული ბიომასა, რომელიც შეიცავდა 2.4 × 10^8 კწე/გ და მეძუძური გოჭების დიეტურ საკვებში მისმა დამატებამ გააუმჯობესა ზრდის მაჩვენებელი, საკვების შეთვისება, ცეკალური მიკრობიოტა, შრატის იმუნოგლობულინები და ნაწლავების მორფოლოგია. ღორების შედარებით სწრაფი ზრდა დაკავშირებული იყო ცხოველის საკვების შედარებით გაზრდილ მოხმარებასთან და უფრო ეფექტიან საკვებთან. ცხოველის საკვებში BS 1–2-ის ფერმენტირებული ბიომასის მზარდი კონცენტრაციით დამატებამ გააუმჯობესა ღორების ზრდის მაჩვენებელი, რაც თანხვედრაშია ვანგისა და სხვების (Wang et al., 2009) მიერ მოწოდებულ მონაცემებთან, რომელთა თანახმადაც, ღორების წონის საშუალო დღიური მატება (ADG) და საკვების საშუალო დღიური მოხმარება (ADFI) დიეტური კვებისას, პირდაპირ უკავშირდებოდა მზარდი კონცენტრაციით (0, 0.05, 0.1 და 0.2%) კომერციალიზებული პრობიოტიკული პროდუქტის (BioPlus 2B®) დამატებას, რომელიც შეიცავდა B. *subtilis*-ის და *B. licheniformis*-ის - 3.2 × 10^9 სიცოცხლისუნარიან სპორას/გ.

ღორების ზრდის უკეთესი მაჩვენებელი, რომლებიც დიეტურად იკვებებოდნენ BS 1–2 - ის ფერმენტირებული ბიომასით თანხვედრაშია ჩოის და სხვების (Choi et al., 2011) მიერ მიღებულ შედეგებთან, შეაფასეს რა თხევად არეში სიღრმული (LF) და მყარფაზოვანი (SSF) ფერმენტაციით მიღებული მულტიმიკრობული პრობიოტიკების (*L. acidophilus, B. subtilis, S. cerevisiae და Aspergillus oryzae* ჩათვლით) მეძუძურ გოჭებში გამოყენების ეფექტიანობა.

პირველ ექსპერიმენტში, ერთ შემთხვევაში გამოყენებული იყო ბაზალური დიეტური საკვები ანტიმიკრობული სუბსტანციების გარეშე (ნეგატიური კონტროლი, NC), ხოლო მეორე შემთხვევაში დაემატა 100 მგ ქლორტეტრაციკლინი/კგ, 0.30% სიღრმულ პირობებში ფერმენტირებულ და 0.30% მყარფაზოვან პირობებში ფერმენტირებულ პრობიოტიკებთან ერთად (პოზიტიური კონტროლი, PC). პრობიოტიკული დიეტური საკვებით გამოკვებილ ღორებში, პირველთან შედარებით, გამოვლინდა საერთო მაჩვენებლების გაუმჯობესება. გარდა ამისა, საერთო წონამატი და გადაუმუშავებელი ცილების ჯამური ნაწლავური მონელებადობა უფრო მაღალი იყო PC და SSF დიეტურად გამოკვებილ ღორებში, ვიდრე ღორებში, რომლებიც გამოიკვებნენ LF დიეტური საკვებით. 28-ე დღეს, NC დიეტურად გამოკვებილ ღორებთან შედარებით, PC და SSF დიეტური საკვებით გამოკვებილ ღორებში ფეკალური *Clostridia* და კოლიფორმები იყო უფრო მცირე რაოდენობით. მე-2 ექსპერიმენტში, ღორებში გამოყენებული იყო 2×2 ფაქტორიალური მიდგომა პრობიოტიკული პროდუქტების (0.30% LF ან SSF და ანტიბიოტიკები 40 მგ ქოლისტინი/კგ ან 44 მგ ლინკომიცინი/კგ) ეფექტის შესწავლისთვის - ზრდის მაჩვენებელზე, ნუტრიენტების ჯამურ ნაწლავურ მონელებადობაზე, წვრილი ნაწლავის მორფოლოგიაზე და ნაწლავის მიკროფლორაზე. იმ ღორებთან შედარებით, რომლებიც იკვებებოდნენ LF პრობიოტიკებით, SSF პრობიოტიკებით გამოკვებილ ღორებში გაუმჯობესდა ზრდის მაჩვენებელი, აღმოჩნდა უფრო მეტი სასარგებლო ნაწლავური ბაქტერია და შემცირდა მავნე ბაქტერიები მლივ ნაწლავში. ანტიბიოტიკებმა არ იქონიეს გავლენა ზრდის მაჩვენებელზე და ასევე, არ გამოვლინდა ანტიბიოტიკი×პრობიოტიკი თანამოქმედებითი ეფექტი სხვა რომელიმე გაზომვად ცვლადებში. ამ შედეგებმა აჩვენა, რომ მყარფაზოვანი ფერმენტაციის მეთოდით მიღებული მულტიმიკრობული პრობიოტიკები გაცილებით ეფექტიანია ზრდის მაჩვენებლების გასაუმჯობესებლად, სასარგებლოა ნაწლავური მიკროფლორისთვის და მავნე ნაწლავური მიკროფლორის შესამცირებლად, ვიდრე სიღრმული ფერმენტაციით მიღებული პრობიოტიკები. უნდა აღინიშნოს, რომ ვონგმა და სხვებმა (Wang et al., 2009) ვერ გამოავლინეს *Bacillus*-ის ბაზაზე დამზადებული პრობიოტიკული პროდუქტის ეფექტი (*B. subtilis* და *B. licheniformis*-ის 3.2×10^9 სიცოცხლისუნარიანი სპორა/გ) ნუტრიენტების

მონელებადობაზე, ზრდასრულ ღორებში. აშკარაა, რომ ექსპერიმენტებში გამოყენებულ ღორებში განსხვავებული შედეგები გამოიწვია განსხვავებულმა ასაკმა, ანუ პრობიოტიკები გაცილებით ეფექტიანად მოქმედებენ მეძუძურ გოჭებზე, ვიდრე ზრდასრულ ღორებზე. დიეტურად გამოკვებილ ღორებში, რომელთა საკვებს დაემატა პრობიოტიკები, ორგანიზმში ნუტრიენტების დიდი რაოდენობით შეკავება შესაძლებელია დაკავშირებული იყოს ნაწლავური გარემოს მოდულაციასთან, ინტესტინალური ტრაქტის მორფოლოგიის გაუმჯობესებასთან და ლორწოვანი გარსის იმუნური სისტემის სტიმულაციასთან.

2.14. პრობიოტიკების გამოყენება მეფრინველეობაში

მეფრინველეობაში პრობიოტიკები გამოიყენება პროდუქტიულობისა და იმუნური რეაქციის გასაუმჯობესებლად (Patterson and Burkholder, 2003). ბოლო წლების განმავლობაში შეინიშნება მეფრინველეობაში ბაცილის ბაზაზე დამზადებული პრობიოტიკების გამოყენების მკვეთრი ზრდა (Hong et al., 2005; Cartman et al., 2008; Jia et al., 2016; Mazanko et al., 2018). *Bacillus*-ის სახეობების სპოროვანი ფორმების მრავალი სხვადასხვა სტრესის მიმართ სტაბილურობისა და მათ მიერ მრავალფეროვანი ფერმენტების, კერძოდ: პროტეაზას, ამილაზას და ლიპაზას პროდუცირების შესაძლებლობის გამო წარმოადგენენ ცხოველის საკვებში ტექნოლოგიურად შესაფერის დანამატს. როგორც ირკვევა, ბაცილის ბაზაზე დამზადებული პრობიოტიკების გამოყენება იმედისმომცემი მიდგომაა ჯანმრთელობის გაუმჯობესებისათვის. უფრო მეტიც, მათი შესაძლებლობა წარმოქმნას ბიოფილმები, ძალზედ მნიშვნელოვანია სამედიცინო და ვეტერინარული დანიშნულების პრობიოტიკების ფუნქციური გამოყენებისთვის (Ushakova et al., 2009). პრობიოტიკული დანამატები შესაძლოა უფრო მეტად ეფექტიანებიც კი იყვნენ სტრესულ გარემოში, ვიდრე ნორმალურ პირობებში. ამდენად, ჯიამ და სხვებმა (Jia et al., 2016) აჩვენეს, რომ *B. subtilis* ამცირებს მიკოტოქსინების უარყოფით ეფექტს კვერცხმდებლობის მაჩვენებელზე, ეფექტიანად აუმჯობესებს კვერცხის ხარისხს და ხელს უშლის აფლატოქსინების ნარჩენი ნივთიერებების დაგროვებას კვერცხში.

ზოგიერთ კვლევაში აღნიშნულია ბროილერებში, კვერცხისმდებელ ქათმებსა და ინდაურებში *Bacillus*-ის სხვადასხვა შტამების გამოყენებით მიღებული უკეთესი შედეგები (Opanlinski et al., 2007; Sen et al., 2012). ასევე, ნაჩვენებია, რომ პრობიოტიკების დამატებამ გააუმჯობესა სხეულის წონამატი, კვერცხის წარმადობა, საკვების კონვერსიის თანაფარდობა, კვერცხის მახასიათებლები და შეამცირა ფრინველების დაცემა (Huang et al., 2004; Li et al., 2006; Molnár et al., 2011). ასევე, სენისა და სხვების ექსპერიმენტში (Sen et al. 2012), ფერმენტაციის შედეგად მიღებული *B. subtilis* LS 1-2 შეერია გადამტანს (სიმინდისა და სოიას ფქვილი) ისეთი პროპორციით, რომ დიეტურ საკვებში 1.5, 3.0 და 4.5 გ/კგ მისი დამატებით მიღებული იქნა 10^7, 10^8 და 10^9 კწე/კგ კონცენტრაციით საკვები რაციონი. *B. subtilis* LS 1-2-ის მზარდი რაოდენობით დამატებამ განაპირობა საკვების შეთვისების სწორხაზოვანი გაუმჯობესება, წონამატი, საკვების კონვერსიის თანაფარდობა (FCR), ნუტრიენტებისა და გადაუმუშავებელი ცილების აშკარა შეკავება ორგანიზმში. იმ ფრინველების საერთო პროდუქტიულობა, რომლებიც იკვებებოდნენ 0.30% და 0.45% *B. subtilis* დამატებული საკვებით, იყო უკეთესი, ვიდრე იმ ფრინველებისა, რომლებიც იკვებებოდნენ საკვებით პრობიოტიკის 0.15% შემცველობით. მეფრინველეობაში კომერციული წარმოების თვალსაზრისით, *B. subtilis* LS 1-2 - ის 0.30% რაოდენობით დამატებით მიღებული დიეტური საკვები აღმოჩნდა საუკეთესო. შიმისა და სხვების (Shim et al., 2010) მიერ წარმოდგენილი შედეგების თანახმად, ასევე 0.30% პრობიოტიკის დამატებით, რომელიც შეიცავდა *B. subtilis*-ს, გაუმჯობესდა ბროილერების დიეტური კვების მაჩვენებელი. სავარაუდოდ, ბროილერებში ზრდის მაჩვენებლისა და კვების ეფექტიანობის გაუმჯობესება მოხდა პრობიოტიკების სხვადასხვა შტამის დამატებით, რამაც თავის მხრივ გამოიწვია პრობიოტიკული მოქმედების კუმულაციური ეფექტი, საკვების შეთვისებისა და მონელების ჩათვლით (Shim et al., 2010), საჭმლის მომნელებელი ფერმენტების აქტივობის გაზრდა, ამიაკის წარმოქმნის შემცირება (Jin et al., 2000) და სასარგებლო მიკრობული პოპულაციის შენარჩუნება (Fuller, 1989). სენმა და სხვებმა (Sen et al., 2012) ივარაუდეს, რომ იმ ფრინველებში ზრდის მაჩვენებლის გაუმჯობესება, რომლებიც იკვებებოდნენ *B. subtilis* LS 1-2 -ით, შესაძლებელია დაკავშირებული იყოს ნუტრიენტების დიდი რაოდენობით შეკავებასთან და ნაწლავის ჯანმრთელობის მდგომარეობის

გაუმჯობესებასთან, რამდენადაც ამ ფრინველებში, საკონტროლო გუნდთან შედარებით, დაბალი იყო *Clostridium*-ებისა და კოლიფორმების რაოდენობრივი შემცველობა. წინამდებარე კვლევის მიხედვით, შესაძლოა, მავნე მიკროორგანიზმების სუპრესიის შედეგად მოხდა ზრდისა და სასარგებლო მიკროორგანიზმების მეტაბოლიზმის გაუმჯობესება, რამაც თავის მხრივ გააუმჯობესა ზრდის მაჩვენებელი და ნუტრიენტების შეკავება.

ასევე, ნაჩვენები იქნა, რომ პრობიოტიკებს შეუძლიათ პათოგენებისგან ფრინველების დაცვა (Jin et al., 2000; La Ragione et al., 2001). დაკვირვების შედეგად მიღებული პოზიტიური შედეგი ფრინველებში შეტანილი პრობიოტიკების რაოდენობის პროპორციული იყო (Lei et al., 2013). სულ ახლახან, გაოს და სხვების (Gao et al., 2017) მიერ ტესტირებული იყო კომერციული მიზნით დამზადებული *B. subtilis*, 2 x 10^{10} კწე/გ შემცველობით. 42 დღის განმავლობაში ბროილერებს კვებავდნენ საბაზო დიეტური საკვებით (I საკონტროლო ჯგუფი), ხოლო სხვა 4 ჯგუფს (II – V ჯგუფი) კვებავდნენ ბაზალური დიეტური საკვებით, რომელსაც დამატებული ჰქონდა *B. subtilis*-ი, შემდეგი კონცენტრაციებით: 100, 150, 200 და 250 მგ/კგ. მიღებული შედეგების თანახმად: IV ჯგუფში საშულო დღიური წონამატი იყო მნიშვნელოვნად მაღალი, ვიდრე I ჯგუფში და V ჯგუფში საკვების საშუალო დღიური შეთვისება იყო ყველაზე მაღალი, თუმცა, სხვა დანარჩენ ჯგუფებთან განსხვავება იყო უმნიშვნელო. ცხოველის საკვების წონამატთან თანაფარდობა საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით, ექსპერიმენტში ჩართულ ყველა ჯგუფში იყო უფო დაბალი და მნიშვნელოვანი განსხვავება გამოვლინდა IV ჯგუფში. გარდა ამისა, *B. subtilis*-ის დამატებამ გაზარდა გადაუმუშავებელი ცილებისა და ცხიმების, ასევე მშრალი მასისა და ორგანული ნივთიერებების მეტაბოლიზმი. *B. subtilis*-მა შეამცირა *E. coli*-სა და *Salmonella*-ს პოპულაცია ბრმა ნაწლავში. ყოველივე ზემოაღნიშნული უჩვენებს, რომ ბროილერების დიეტურ საკვებში *B. subtilis*-ის დამატებას შეუძლია გააუმჯობესოს ზრდის მაჩვენებელი, გაზარდოს საკვების ეფექტიანობა, დაარეგულიროს შრატის ინდექსი და შეამციროს მავნე ბაქტერიები ნაწლავურ ტრაქტში.

მაზანკომ და სხვებმა (Mazanko et al., 2018) შეისწავლეს ბაცილის შემცველი პრობიოტიკული პრეპარატის ეფექტი კვერცხისმდებელ ქათმებსა და მამლებში. პრობიოტიკული პრეპარატი დამზადდა *B. subtilis* KATMIRA 1933-ითა და *B.*

amyloliquefaciens B-1895-ით ფერმენტირებული სოიას პროდუქტის სახით. პრობიოტიკული ბაქტერიების ფრინველების დიეტურ საკვებში შეტანამ გაზარდა სპერმის პროდუცირება, კვერცხის წარმადობა, გააუმჯობესა კვერცხის ხარისხი და გამოსავლიანობა. ავტორებმა ივარაუდეს, რომ ეს თვისებები წარმოადგენენ დიდი რაოდენობით ლიტიკური ფერმენტებისა და მეტაბოლიტების პროდუცირების შედეგს, რაც გამოიხატება ანტიოქსიდანტურ და დნმ დამცავი თვისებებით, შესწავლილ შტამებში (Prazdnova et al., 2015), ისევე როგორც, ბაცილების მიერ პროდუცირებული პროტეაზები, ამილაზები და ცელულაზები, რომლებიც უზრუნველყოფენ საკვების უკეთეს შეთვისებას.

აღსანიშნავია პრობიოტიკების ძლიერი გავლენა წყლის ბინადარ ორგანიზმებზე. აკვაკულტურები წარმოადგენენ მსოფლიო მასშტაბით იმედისმომცემ და სწრაფად განვითარებად სასურსათო წარმოების სექტორს, ვინაიდან სამომხმარებლო მოთხოვნილება თევზისა და აკვაკულტურებისგან მიღებულ სურსათზე მუდმივად იზრდება. ბოლო წლებში, საქართველოში აკვაკულტურების მოშენება და წარმოება საკმაოდ გაიზარდა, გახდა რა ეკონომიკურად მნიშვნელოვანი ინდუსტრია. აკვაკულტურების წარმოების ინტენსიფიკაციასა და კომერციალიზაციასთან ერთად, დაავადებები წარმოადგენენ ერთ-ერთ სერიოზულ პრობლემას მეთევზეობის ინდუსტრიისათვის. პრობიოტიკულ ორგანიზმებს შესწევთ ძალა იოლად უზრუნველყონ აკვაკულტურების მდგრადი განვითარება, რადგან მათ შეუძლიათ გააძლიერონ ორი ძირითადი ფაქტორი - ზრდა და დაავადებებისადმი რეზისტენტობა (Das et al., 2017). *Bacillus* sp. ასოცირდება წყლის ხარისხის გაუმჯობესებათან, გარემოში პათოგენური პოპულაციების შემცირებასთან, სიცოცხლისუნარიანობის გაზრდასთან, ზრდის გააქტიურებასთან და წყლის ორგანიზმების ჯანმრთელობის მდგომარეობის გაუმჯობესებათან. ამის მიზეზი მდგომარეობს იმაში, რომ გრამუარყოფით ბაქტერიებთან შედარებით, როგორც წესი, *Bacillus* spp. არის უფრო ეფექტიანი ორგანული ნედლეულის CO_2 -ის კონვერსიის პროცესში.

2.15 პრობიოტიკების გამოყენება მეფუტკრეობაში

და ბოლოს, არსებობს *Bacillus*-ს პრობობიოტიკების გამოყენების შესამჩნევი ზრდა მეფუტკრეობაში. ფუტკრის ამერიკული სიდამპლე (AFB) ფართოდ გავრცელებული დაავადებაა და წარმოადგენს ერთ-ერთ ძირითად საფრთხეს მეფუტკრეობაში, იწვევს რა მეთაფლია ფუტკრების პოპულაციისა და შესაბამისად, თაფლის, ყვავილის მტვრის, დინდგელის, ფუტკრის რძისა და ფუტკრის ცვილის წარმოების მნიშვნელოვან შემცირებას (Genersch et al., 2006). ფუტკრის ამერიკული სიდამპლის გამომწვევი *Paenibacillus larvae* ყველაზე მეტად აზიანებს მეთაფლია ფუტკრის *Apis mellifera*-ს ბარტყებს. ფუტკრის განვითარების ბარტყობის სტადიაში *P. larvae*-ს 10 სპორაზე ნაკლებმაც კი შესაძლებელია გამოიწვიოს სიკვდილიანობა (Brodsgaard et al., 2000). *P. larvae*-ს სპორებით ფუტკრის ბარტყების ინფიცირება ძირითადად ხდება ზრდასრული ძიძა ფუტკრების მიერ, მათი გამოკვების დროს. დაინფიცირების შემდეგ, სპორები იჭრებიან მეთაფლია ფუტკრის საჭმლის მომნელებელი ტრაქტის ეპითელიუმში და მრავლდებიან საკმარის რაოდენობამდე, რის შემდეგაც კლავენ ფუტკრის ბარტყებს დაჭუპრების სტადიამდე. ინფექციის მიმართ მგრძნობელობა დამოკიდებულია ფუტკრის ბარტყის ასაკზე და ბარტყის ასაკის ზრდასთან ერთად იზრდება დაინფიცირებისთვის საჭირო სპორების რაოდენობა (Genersch, 2010). უნდა აღინიშნოს, რომ *P. larvae*-ს კონტროლი ბევრ სირთულესთანაა დაკავშირებული, ვინაიდან მის სპორები ინარჩუნებენ სიცოცხლისუნარიანობას დიდი ხნის განმავლობაში, არახელსაყრელ გარემო პირობებშიც კი (Genersch, 2010). სხვადასხვა ქვეყნის გამოცდილებით ამ დაავადების გავრცელების შეზღუდვა ხდება დაავადებული კოლონიების დაწვის გზით. ზოგიერთ ქვეყანაში კი ანტიბიოტიკების გამოყენება წარმოადგენს დაინფიცირებული სკების დაწვით დაავადებასთან ბრძოლის ალტერნატივას. ამჟამად, ერთადერთი ანტიბიოტიკი, რომელიც რეკომენდებულია ფუტკრებში ამერიკული სიდამპლის პროფილაქტიკისა და კონტროლისთვის არის ოქსიტეტრაციკლინი; თუმცა, უკვე არსებობს საკმარისი მტკიცებულება, რომ აშშ-ს, კანადისა და არგენტინის ზოგიერთ რეგიონში გამოყოფილია *P. larvae*-ს ოქსიტეტრაციკლინ-რეზისტენტული იზოლატები (Evans, Armstrong, 2005; Alippi, Reynaldi, 2006).

ანტიბიოტიკების ფართოდ გამოყენება განაპირობებს ანტიბიოტიკო-რეზისტენტული ბაქტერიული შტამების ბუნებრივ გადარჩევას, ამცირებს ფუტკრის სიცოცხლის ხანგრძლივობას, იწვევს ფუტკრის ნორმალური მიკრობიოტის დისბალანსს და წარმოქნის თაფლის ანტიბიოტიკების ნარჩენებით კონტამინაციის რისკს (Genersch, 2010; Sabaté et al., 2012). აღნიშნულიდან გამომდინარე, ფუტკრის ამერიკული სიდამპლის კონტროლისთვის ალტერნატიული, კონტამინაციის უნარის არმქონე ბიოციდის შერჩევა წარმოადგენს დიდ გამოწვევას, რაც გააუმჯობესებს თაფლის ხარისხს და გამორიცხავს მასში არასასურველი ნივთიერებების ნარჩენების არსებობას (González, Marioli, 2010). სწორედ ამიტომ, ფუტკრის ამერიკული სიდამპლის კონტროლისთვის შემოთავაზებული იქნა ნატურალური ანტიმიკრობული სუბსტანციები, როგორც იმედისმომცემი ალტერნატივები (Gende et al. 2009). ფლეზარის და სხვების მიერ (Flesar et al., 2010) *P. larvae*-ს წინააღმდეგ ტესტირებული იქნა სხვადასვა ნატურალური ნივთიერებები (ფლავონოიდები, ალკალოიდები, ტერპენოიდები) და მცენარეული ნედლი ექსტრაქტები. სუბსტანციებმა, როგორიცაა კაპსაცინი, ნორჰიდროგუაირეტიკის მჟავა, თიმოქინონი, ტრანს-2-ჰექსანალი და *Humulus lupulus* და *Myrtus communis* მცენარეულმა ექსტრაქტებმა აჩვენეს *P. larvae*-ს ზრდის მნიშვნელოვანი ინჰიბირება. არომატული მცენარეების *Eucalyptus cinerea* და *Mintostachys verticillata* წყალში ხსნადმა ექსტრაქტებმა ასევე განაპირობეს *P. larvae* - ს შესამჩნევი ინჰიბირება (González, Marioli, 2010).

ანტაგონისტი ბაქტერიებით ბიოკონტროლი ასევე წარმოადგენს ფუტკრის ამერიკული სიდამპლის კონტროლის საინტერესო ალტერნატივას და *P. larvae*-ს ინჰიბირება რამდენიმე ბაქტერიული შტამით, მათ შორის ბაცილებით, უკვე აღწერილია (Alippi, Reynaldi, 2006; Sabaté et al., 2009). ფუტკრის ბარტყიდან იზოლირებულმა ოთხმა ბაქტერიამ *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter* sp., *Brevibacillus formosus* და *Bacillus fusiformis* მოახდინა *P. larvae*-ს ზრდის სრული ინჰიბირება (Evans, Armstrong, 2005). ზოგადად, *Bacillus*-ის არატოქსიგენური სახეობები, რომლებიც წარმოქმნიან ანტიბაქტერიულ პეპტიდებს, ითვლებიან უსაფრთხოდ და შესაძლებელია მათი გამოყენება, როგორც აგრარული და ვეტერინარული მიზნებისთვის, ასევე ადამინის მოხმარებისთვის (Motta et al., 2007;

Sabaté et al., 2009). შესაბამისად, *Bacillus subtilis*-ის სამი შტამი იზოლირებული იქნა თაფლის ნიმუშებიდან და ფუტკრის ნაწლავიდან და მათი ანტიბაქტერიული აქტივობა ტესტირებული იქნა *P. larvae* - ს მიმართ (Sabaté et al., 2009). აღნიშნული შტამები აპროდუცირებენ ლიპოპეპტიდებს - სურფაკტინებს, რომლებიც დაუყოვნებლივ ზემოქმედებენ *P. larvae* - ს სიცოცხლისუნარიანობაზე. აღსანიშნავია, რომ სურფაკტინის უჯრედებთან კონტაქტმა უმალ შეამცირა ცოცხალი უჯრედების რაოდენობა ორჯერ, ხოლო უჯრედებისა და სურფაკტინის შემდგომ უფრო ხანგრძლივმა კონტაქტმა აღარ გამოიწვია მაინჰირებელი ეფექტის გაზრდა. ავტორებმა დაასკვნეს, რომ ამ პათოგენის ვეგეტატური უჯრედები სურფაკტინის მიმართ მგრძნობიარეები არიან მხოლოდ ძალიან მოკლე დროით კონტაქტისას. უნდა აღინიშნოს, რომ სურფაკტინის სინთეზი შესწავლილი იქნა რამდენიმე საკვებ არეში, კერძოდ: BHI (გლუკოზასა და პეპტონთან ერთად), NB (ნახშირბადის წყაროს გარეშე) და MEL მელასაშემცველ საკვებ არეში. *Bacillus* - ის სამი შტამი ასინთეზირებდა სურფაკტინს ყველა სახის საკვებ არეში; თუმცა, *P.* larvae - ს ინჰიბირებისთვის სურფაკტინის საკმარისი კონცენტრაცია მიღწეულ იქნა მხოლოდ BHI და MEL საკვებ არეებში. *B. subtilis* G2III-ს მიერ სურფაკტინი ყველაზე დიდი რაოდენობით სინთეზირებული იქნა 72 სთ ინკუბაციის შემდეგ, 37°C ტემპერატურაზე, კონცენტრაციით - 1391 პირობითი ერთეული/მლ და 2782 პირობითი ერთეული/მლ BHI და MEL ბულიონებში, შესაბამისად.

იგივე ავტორებმა (Sabaté et al., 2012) გამოიყენეს *B. subtilis* subsp. *subtilis* Mori2 ფუტკრების კოლონიებში, როგორც მონოკულტურა 1 ლ შაქრის სიროფში (125 გ/ლ) 10^5 სპორა/მლ საბოლოო კონცენტრაციით, ფუტკრის კოლონიის განვითარების შესაფასებლად. კოლონიის სტატუსი გაუმჯობესდა *Bacillus* - ის მეორედ გამოყენების შემგომ, ექსპერიმენტის დასრულებამდე. ფუტკრების რაოდენობა 26 %-ით იყო გაზრდილი კონტროლთან შედარებით. გარდა ამისა, მიღებული თაფლის რაოდენობა დამუშავებულ სკებში 17 %-ით უფრო მეტი იყო, ვიდრე საკონტროლო სკებში. გარდა ამისა, *Nosema* sp. და *Varroa* sp. foretica-ს სპორების რაოდენობა დამუშავებულ სკებში უფრო მცირე იყო, ვიდრე საკონტროლო სკებში. ამ შედეგების გათვალისწინებით, საექსპერიმენტო სკებში აღინიშნებოდა *B. subtilis* subsp. *subtilis* Mori2-ს მიერ განაპირობებული ფუტკრების მაღალი პროდუქტიულობა -

პირველ რიგში იმიტომ, რომ ეს მიკროორგანიზმი ასტიმულირებდა დედა ფუტკრის მიერ კვერცხის დებას, რაც უფრო ზრდიდა ფუტკრების რაოდენობას და შემდგომში, იწვევდა მომატებულ ღალიანობას და მეორე, იმიტომ, რომ ამცირებდა ფუტკრის ორი საშიში დაავადების - ნოზემატოზისა და ვაროატოზის პრევალირებას.

ბენიტესმა და სხვებმა (Benitez et al., 2012) აჩვენეს, რომ *B. amyloliquefaciens* LBM 5006 აწარმოებს ანტიბაქტერიულ ფაქტორს, რომელიც აქტიურია *P. larvae*-ს მიმართ. ანტიბაქტერიული აქტივობა გამოვლენილი იქნა ზრდის ლოგარითმული ფაზის შუაში და მაქსიმუმს მიაღწია სტაციონარული ფაზის განმავლობაში. *P. larvae* - ს უჯრედების სუსპენზიაზე ამ ანტიმიკრობული პრეპარატის ექსპოზიციამ გამოიწვია უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობის დაქვეითება და ოპტიკური სიმჭიდროვის შემცირება, რაც უკავშირდება უჯრედის ლიზისს. *B. amyloliquefaciens* LBM 5006 - ს ანტიბაქტერიული ფაქტორმა აჩვენა ბაქტერიოციდული ეფექტი *P. larvae* - ს უჯრედებისა და სპორების მიმართ. ელექტრონულ მიკროსკოპში სკანირებისას ნათლად გამოჩნდა უჯრედის დაზიანებული გარსი და პროტოპლაზმური ნივთიერების დანაკარგი. ანტიბაქტერიული ფაქტორი სტაბილურობას ინარჩუნებდა 80°C ტემპერატურამდე, მაგრამ მგრძნობიარე იყო პროტეინაზა K-ს და ტრიპსინის მიმართ. მასს სპექტრომეტრულმა ანალიზმა აჩვენა, რომ ანტიბაქტერიული აქტივობა დაკავშირებულია იტურინის მსგავს ლიპოპეპტიდებთან.

ამდენად, განხილული ლიტერატურის მონაცემები ცხადყოფენ, რომ არაპათოგენური სპორაწარმომქმნელი ბაქტერია შესაძლებელია გამოყენებული იქნას როგორც პრობიოტიკი მეთაფლია ფუტკრის იმუნიტეტის გასაუმჯობესებლად, ფუტკრის დასახმარებლად როგორც ბარტყის, ასევე სიცოცხლის შემდგომ სტადიებზე, მაშინ როდესაც უკვე დახასიათებული შტამების ანტიბაქტერიული ნაერთები შესაძლებელია გამოყენებული იქნას როგორც ბიოლოგიური კონტროლის აგენტები.

3. მასალები და კვლევის მეთოდები

3.1. პრობიოტიკული ბაქტერიები და ინოკულუმის მომზადება

კვლევისთვის შერჩეული *B. subtilis* KATMIRA 1933 და *B. amyloliquefaciens* B-1895 კულტურები მიღებული იქნა რუსეთის ინდუსტრიული მიკროორგანიზმების ეროვნული კოლექციიდან (RNCIM, მოსკოვი). მოწოდებული შტამები ინახებოდნენ პეპტონისა და საფუარის ექსტრაქტის შემცველ აგარიან არეზე, 4°C ტემპერატურაზე. ინოკულუმის მოსამზადებლად *Bacillus* spp. იზრდებოდა 37°C-ზე, 24 საათის განმავლობაში, როტარულ სანჯღრეველაზე 160 ბრუნი/წუთში. საკვები არეს შემადგენლობა იყო შემდეგი (გ/ლ): გლუკოზა - 2.0, KH_2PO_4 – 1.0, $MgSO_4$ – 0.5, პეპტონი - 2.0, საფუვრის ექსტრაქტი - 2.0 და pH 7.0. შემდგომი გამოყენების მიზნით, მიღებული უჯრედები ინოკულუმის სახით განზავდა სტერილურ ფიზიოლოგიურ ხსნარში სიღრმული და მყარფაზოვანი ფერმენტაციისათვის. ბაქტერიული სუსპენზიის განზავება ხდებოდა ისე, რომ სათესი მასალის 1 მლ გვაძლევდა 10^6 უჯრედს/მლ დათესილ არეში.

3.2. გამოყენებული მცენარეული ნედლეული

ზრდის ლიგნოცელულოზურ სუბსტრატად გამოყენებულ იქნა ხორბლის ქატო, ხორბლის ნამჯა, ხორბლის ან სიმინდის ეთანოლის წარმოების ნარჩენები (EPR), მანდარინისა და ბანანის ქერქი, სიმინდის კაჭეჭი, სოია, მზესუმზირის შროტი, მზესუმზირას კოპტონი და სოკოს წარმოების შემდეგ მიღებული ნარჩენი (mushroom spent substrate, mushroom SS). ყველა აღნიშნული მცენარეული წარმოშობის ნედლეული წინასწარ გაშრა 50°C-ზე და შემდგომ დაიფქვა ფქვილის სახით.

3.3. სიღრმული კულტივირების პირობები

ბაცილების სიღრმული კულტივირება ხდებოდა სანჯღრეველაზე „Innova 44“ (New Brunswick Scientific, USA) 160 ბრუნი წუთში, 37° C ტემპერატურაზე, 250 მლ-იან ერლენმეიერის კოლბებში, რომლებიც შეიცავდნენ 50 მლ ბაზალურ საკვებ არეს

შემდეგი შემადგენლობით (გ/ლ): KH_2PO_4 - 1.0, $MgSO_4$ – 0.5, საფუარის ექსტრაქტი - 3.0, პეპტონი - 3.0, გლუკოზა - 1.0. ცალკე ცდებში ნახშირბადის წყაროდ გამოყენებული იყო ქსილოზა, გლუკოზა, საქაროზა და გლიცეროლი 5 გ/ლ კონცენტრაციით. ზრდის ლიგნოცელულოზურ სუბსტრატად გამოყენებულ იქნა სხვადასხვა მცენარეული ნედლეული კონცენტრაციით 40 გ/ლ. ყველა საკვები არის საწყისი pH სტერილიზაციამდე დაყვანილი იქნა 7.0-მდე, ნახშირბადის წყაროს გარეშე. აზოტის წყაროდ ტესტირებულ იქნა სამი არაორგანული [KNO_3, $(NH_4)_2SO_4$, NH_4NO_3] და სამი ორგანული ნაერთი (პეპტონი, საფუარის ექსტრაქტი, კაზეინის ჰიდროლიზატი) კონცენტრაციით 20 მილიმოლი. ასევე, საკონტროლოდ გამოიყენებოდა საკვები არე აზოტის წყაროს გარეშე.

სიღრმული კულტივირების შემდეგ ხდებოდა ბიომასის სეპარირება ცენტრიფუგირებით (Eppendorf 5417R, Germany) 10000 x g, 5 წუთის განმავლობაში, 4^0 C ტემპერატურაზე. სუპერნატანტში ტესტირებული იქნა pH, რედუცირებული შაქრების შემცველობა და ცელულაზური აქტივობა. ყველა ექსპერიმენტი განხორციელდა 2-ჯერ, 3-3 პარალელით. ყველა შედეგი გამოსახულია როგორც საშუალო მნიშვნელობა ± SD. საშუალო მნიშვნელობების სტანდარტული გადახრების გამოთვლა მოხდა Microsoft Office 2010 Excel-ის პროგრამით და მხოლოდ $p \leq 0.05$-ს მნიშვნელობა იქნა გათვალისწინებული, როგორც სტატისტიკურად მნიშვნელოვანი.

3.4. მყარფაზოვანი ფერმენტაციის პირობები

მცენარეული ნარჩენების მყარფაზოვანი ფერმენტაცია მიმდინარეობდა 125 მლ-იან კოლბებში, რომელიც მოიცავდა 5 გ ლიგნოცელულოზურ სუბსტრატს, დატენიანებულს 15 მლ საკვები არით შემდეგი შემადგენლობით (გ/ლ): KH_2PO_4 - 1.0; $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ – 0.5; საფუარის ექსრაქტი - 2.0; პეპტონი - 3.0. ცალკე ექსპერიმენტისას, ზრდის საუკეთესო სუბსტრატის (სიმინდის კაჭეჭის) რაოდენობა ვარირებდა 5 გ-დან 20 გ-მდე და საკვები არე დაემატა ზრდის სუბსტრატს თანაფარდობით 1:4 (წონა/მოცულობა). სპორების ოპტიმალური პროდუცირების მიზნით ტესტირებულ იქნა აზოტის ორი არაორგანული [KNO_3, $(NH_4)2SO_4$] და სამი ორგანული წყარო (პეპტონი, საფუარის ექსტრაქტი და კაზეინის ჰიდროლიზატი) აზოტის

კონცენტრაციით 100 მილიმოლი. ამ ექსპერიმენტების დროს საფუარის ექსტრაქტი ამოღებულ იქნა საკვები არიდან. პარალელურად კონტროლდებოდა აზოტის წყარო ოპტიმალური რაოდენობის შესარჩევად.

თითოეული კოლბა ინოკულირებული იქნა 1 მლ განზავებული ბაქტერიული სუსპენზიით ისე, რომ საკვებ არეში უჯრედების რაოდენობა იყო 1-2 x 10^6/გ სუბსტრატზე. კოლბების შიგთავსის კარგად შერევის შემდეგ ხდებოდა ბაქტერიების კულტივირება თერმოსტატში 37^{0}C ტემპერატურაზე, 4 დღის განმავლობაში. მყარფაზოვანი ფერმენტაციის დასრულების შემდეგ, ფერმენტირებული ბიომასა აიწონა და გაიყო სამ წილად. ერთი წილი გამოყენებულ იქნა სპორების დასათვლელად; ამ მიზნით ბიომასის 1 გ მოთავსდა სტერილურ კოლბაში, შეერია 10 მლ სტერილური ფიზიოლიგიური ხსნარი, რასაც დამატებული ჰქონდა 0.1% Tween 80 და დავორტექსდა. მეორე წილი გამოყენებულ იქნა ფერმენტული აქტივობის გასაზომად, კერძოდ, ბიომასის 2 გ ექსტრაგირებული იქნა ორჯერადად 15 მლ დისტილირებულ წყლით (30 მლ საერთო ოდენობით) და ბიომასა გამოყოფილა იქნა ცენტრიფუგირებით 5 წუთის განმავლობაში 10 000 x g, 4^{0}C-ზე. სუპერნატანტში გაიზომა pH, რედუცირებული შაქრები და ფერმენტული აქტივობა. დარჩენილი ბიომასა აიწონა და გამოშრა 105^{0}C ტემპერატურაზე, მშრალი წონის განსასაზღვრად.

3.5. კულტივირება ფერმენტიორში

კოლბებში სიღრმული კულტივირების პირობების ოპტიმიზაციის შემდეგ, პრობიოტიკების წარმოების შესაძლებლობა გადამოწმებული იქნა ლაბორატორიულ ფერმენტიორში. ამისთვის გამოყენებული იქნა 7 ლიტრი ტევადობის ფერმენტიორი LIFLUS GX (კორეული წარმოების), აღჭურვილი pH-ის, ტემპერატურის, pO_2-ის ელექტროდებით და Rushton-ის 2 იმპელერით. ფერმენტიორი შევსებული იყო 5 ლ ოპტიმიზებული საკვები არით, შემდეგი შემადგენლობით (გ/ლ): მანდარინის ქერქი - 40.0, პეპტონი - 8.0, KH_2PO_4 – 1.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.5, პოლიპროპილენგლიკოლი 2000 - 5 მლ, pH – 7.0. ასევე, *B. subtilis* KATMIRA 1933 კულტივირების დროს საკვებ არეს დისტილირებული წყლის ნაცვლად დაემატა 1 ლ ყველის შრატი. ფერმენტიორის სტერილიზაციის შემდგომ (121^{0}C, 40 წთ), საკვებ არეში ჩაითესა ბაქტერიული კულტურები, საბოლოო კონცენტრაციით 1-3 x 10^6 უჯრედი/მლ.

B. subtilis KATMIRA 1933 კულტივირება მიმდინარეობდა 37^{0}C ტემპერატურაზე, შემრევის სიჩქარე იყო 300 ბრუნი წუთში, ჰაერის მიწოდება - 1.0 ლ/ 1.0 ლ არეზე/წუთში. პირველი 3 დღის განმავლობაში საკვები არის pH იყო 6.7, ხოლო მე-4 დღეს - 8.0. *B. amyloliquefaciens* B-1895 კულტივირების დროს საკვები არის pH არ კონტროლდებოდა, შემრევის სიჩქარე იყო 250 ბრუნი წუთში, ჰაერის მიწოდება ხდებოდა 0.5 ლ/ 1 ლ არეზე/წუთში პირველი დღის განმავლობაში, შემდგომ - 1.0 ლ/1.0 ლ არეზე/წუთში.

ფერმენტაციის ყველა პროცესის მიმდინარეობისას, ყოველდღიურად ხდებოდა ვეგეტატიური უჯრედებისა და სპორების დათვლა, მოწმდებოდა ცელულაზური და ქსილანაზური აქტივობა, რედუცირებული შაქრების შემცველობა.

3.6. პრობიოტიკების წარმოების მასშტაბირება მყარფაზოვანი ფერმენტაციის პირობებში

პრობიოტიკების პროდუცირების მასშტაბირებისთვის 1 კგ სიმინდის დაფქული კაჭეჭი გაიჟღინთა ოპტიმიზებული საკვები არით და განთავსდა პოლიპროპილენის აირშეღწევად, მემბრანიან პარკებში Microsac PP75/BEU6/X33-57 (SACO2, Belgium) ავტოკლავში 1 საათის განმავლობაში, 121^{0}C ტემპერატურაზე, შემდგომი სტერილიზაციისთვის. გაცივების შემდეგ მოხდა სუბსტრატის ინოკულირება ბაქტერიული სუსპენზიით, საბოლოო კონცენტრაციით 1 x 10^6 უჯრედი/გ სუბსტრატზე. ინოკულუმის თანაბრად გადასანაწილებლად მოხდა სუბსტრატის კარგად შერევა. ბაქტერიების კულტივირება ხდებოდა კონტროლირებადი კლიმატური პირობების მქონე კამერაში, 32^{0}C ტემპერატურაზე, 4 დღის განმავლობაში.

3.7. სპორების დათვლა

კოლბებიდან ამოღებულ თითოეულ კულტურის 1 მლ დაემატა 9 მლ ფიზიოლოგიურ ხსნარს, ინტენსიურად დავორტექსდა და გაცხელდა 80^{0}C ტემპერატურაზე, 10 წუთის განმავლობაში, ვეგეტატური უჯრედების განადგურების მიზნით. ამის შემდგომ, მომზადდა 10 ჯერადი განზავებების სერია და დავორტექსდა ჰომოგენური

სუსპენზიის მისაღებად. 10^6 – 10^9 განზავებული სუსპენზიებიდან აღებულ იქნა 100-100 მკლ და გადაითესა გასტერილებული აგარიანი საკვები არის ზედაპირზე, მინის სტერილური წკირის საშუალებით. აგარიანი საკვები არის შემადგენლობა იყო შემდეგი (გ/ლ): გლუკოზა - 2.0, KH_2PO_4 - 1.0, $MgSO_4$ – 0.5, პეპტონი - 2.0, საფუარის ექსტრაქტი - 2.0, აგარ-აგარი - 17.0, pH – 7.0. პეტრის თასებზე ინკუბაცია მიმდინარეობდა თერმოსტატში 37^{0}C ტემპერატურაზე, 24 და 48 საათის განმავლობაში. შემდგომ, დათვლილი იქნა თასების ზედაპირზე წარმოქმნილი თითოეული კოლონია. საშუალო მნიშვნელობა მიღებული იქნა როგორც სპორების რაოდენობა 1 მლ-ში.

3.8. ცელულაზისა და ქსილანაზის აქტივობის შეფასება

ბიომასის სეპარირების შემდგომ, მიღებული სუპერნატანტი ტესტირებული იქნა კარბოქსიმეთილცელულაზის (CMC-აზა, EC 3.2.1.4.) აქტივობაზე IUPAC-ის რეკომენდაციების შესაბამისად. ფერმენტული რეაქცია მიმდინარეობდა 50 მილიმოლ ციტრატულ ბუფერში (pH 5.0) 1%-იანი დაბალი სიბლანტის კარბოქსიმეთილცელულოზის გამოყენებით 50^{0}C ტემპერატურაზე, 10 წუთის განმავლობაში (Ghose, 1987). ქსილანაზის (EC 3.2.1.8.) აქტივობა განისაზღვრა იგივე პირობებში, მაგრამ როგორც ფერმენტის სუბსტრატი გამოყენებული იქნა არყის ქსილანი (Roth 7500, გერმანია) (Bailey et al., 1992). გლუკოზისა და ქსილოზის სტანდარტული მრუდები გამოყენებულ იქნა შესაბამისად, ცელულაზისა და ქსილანაზის აქტივობის გამოსათვლელად. ყველა სინჯში გამონთავისუფლებული მარედუცირებელი შაქრების გასაზომად გამოყენებულ იქნა დინიტროსალიცილის მჟავის რეაგენტი (Miller, 1959). ფერმენტის აქტივობის ერთეულად განისაზღვრა ფერმენტების რაოდენობა, რომელიც საჭიროა 1 მილიმოლი მარედუცირებელი შაქრების გამოსანთავისუფლებლად, 1 წუთის განმავლობაში.

3.9. *Bacillus subtilis* KATMIRA 1933 და *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 - ს ანტიბაქტერიული აქტივობის *in vitro* ტესტირება

კვლევისათვის გამოყენებული იქნა *B. subtilis* KATMIRA 1933 და *B. amyloliquefaciens* B-1895 სიღრმული ფერმენტაციით მიღებული სპორები. მომზადდა აღნიშნული სპორების სუსპენზიები ფიზიოლოგიურ ხსნარში 10^7, 10^8, 10^9 კონცენტრაციით. თითოეული განზავებიდან სპორები გადაითესა მყარაგარიან საკვებ არეზე (პეტრის თასებზე, 3-3 პარალელი). თერმოსტატში 37^0 C ტემპერატურაზე 24 საათით დაყოვნების შემდგომ, კოლონიების საუკეთესო ნაზრდის მიხედვით, კვლევისთვის შერჩეული იქნა 2 თასი.

B. subtilis KATMIRA 1933 და *B. amyloliquefaciens* B-1895 სპორების გამორჩევისათვის გამოყენებული იყო რეპლიკაციის მეთოდი. კერძოდ, შერჩეული 2 თასიდან სათითაოდ, რეპლიკატორის საშუალებით მოხდა ინოკულუმის გადათესვა 3-3 მყარაგარიან პეტრის თასზე. შემდგომ, უკვე, პირველგადათესილ პეტრის თასების სახურავებზე 3-ჯერ დაეწვეთა ქლოროფორმის კონცენტრირებული ხსნარი 0.5 მლ-ს ოდენობით, თავდახურულ მდგომარეობაში, თავსახურით ქვემოთ მოხდა ქლოროფორმის აორთქლება, განიავება და ექვსივე თასი მოთავსდა თერმოსტატში 37^0 C ტემპერატურაზე. 24 საათის შემდეგ მოხდა გაზრდილი კოლონიების შესწავლა და შემდგომი კვლევისთვის შეირჩა ქლოროფორმით დამუშავების შედეგად გადარჩენილი კოლონიები.

ტესტირებისთვის გამოყენებული ფუტკრის ამერიკული სიდამპლის გამომწვევის - *P. larvae* სტანდარტული შტამი მოწოდებულ იქნა საქართველოს სოფლის მეურნეობის სამინისტროს ლაბორატორიის მიერ.

B. subtilis KATMIRA 1933 და *B. amyloliquefaciens* B-1895 სპორების *P. larvae*-ს მიმართ ანტიბაქტერიული აქტივობის შესასწავლად გამოყენებული იქნა დისკურ-დიფუზიური მეთოდი. კერძოდ, მომზადდა თითოეული ბაცილის სპოროვანი ფორმების შემცველი ხსნარი ცალ-ცალკე, 3-3 სინჯარაში: განუზავებელი, 10^{-1}, 10^{-2} კონცენტრაციით. ასევე, მყარაგარიან პეტრის თასებზე (2-2 პარალელი) გადაითესა *P. larvae* და გადანაწილდა საკვები არის მთელ ზედაპირზე, მინის სტერილური წკირის მეშვეობით. შემდეგ ეტაპზე, საშრობი ქაღალდის სტერილური დისკები სპორების

სამივე განზავების სინჯარებში ჩაყურსვის (დასველების) შემდგომ განთავსდა *P. larvae* - თი მოთესილ ექვსივე თასის ზედაპირზე, სიმეტრიულად და მოთავსდა თერმოსტატში, 37^{0}C ტემპერატურაზე.

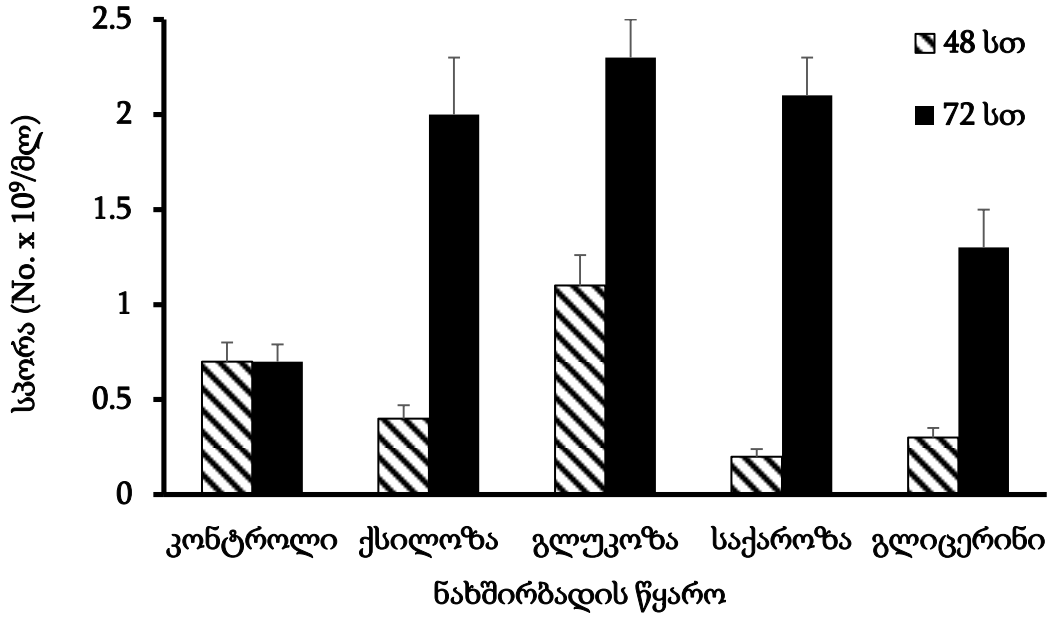
4. კვლევის შედეგები

4.1. *Bacillus subtilis* KATMIRA 1933-სა და *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895-ს პრობიოტიკების წარმოების ფიზიოლოგიური თავისებურების დადგენა სიღრმული ფერმენტაციის დროს

4.1.1. ნახშირბადის წყაროს გავლენა *Bacillus* spp.-ს სპორების პროდუცირებაზე

სპორაწარმომქმნელი პრობიოტიკების წარმოების ტექნოლოგიის შემუშავებისა და დანერგვისთვის საჭიროა შესწავლილი იქნას ამ მიკროორგანიზმების ზრდისა და სპორულაციის კვებითი მოთხოვნები. ლიტერატურის მიმოხილვა ადასტურებს, რომ ბაცილების ზრდა, ბიომასის და სპორების გამოსავლიანობა დამოკიდებულია საკვებ არეში ნახშირბადის ხელმისაწდომ წყაროზე და მის კონცენტრაციაზე.

ექსპერიმენტის პირველ ეტაპზე შევისწავლეთ *B. subtilis* KATMIRA 1933-ს საკვები მოთხოვნილებები, ბაქტერიების კულტივირების დროს სინთეზურ არეში ნახშირბადის სხვადასხვა წყაროს თანაობისას.



ფიგურა 1. ნახშირბადის წყაროების გავლენა *B. subtilis* KATMIRA 1933-ს სპორების გამოსავლიანობაზე.

მიღებული შედეგები მოწმობენ, რომ საკონტროლო საკვებ არეში (ნახშირბადის წყაროს გარეშე) ხელმისაწვდომი საფუარის ექსტრაქტისა და პეპტონის ხარჯზე,

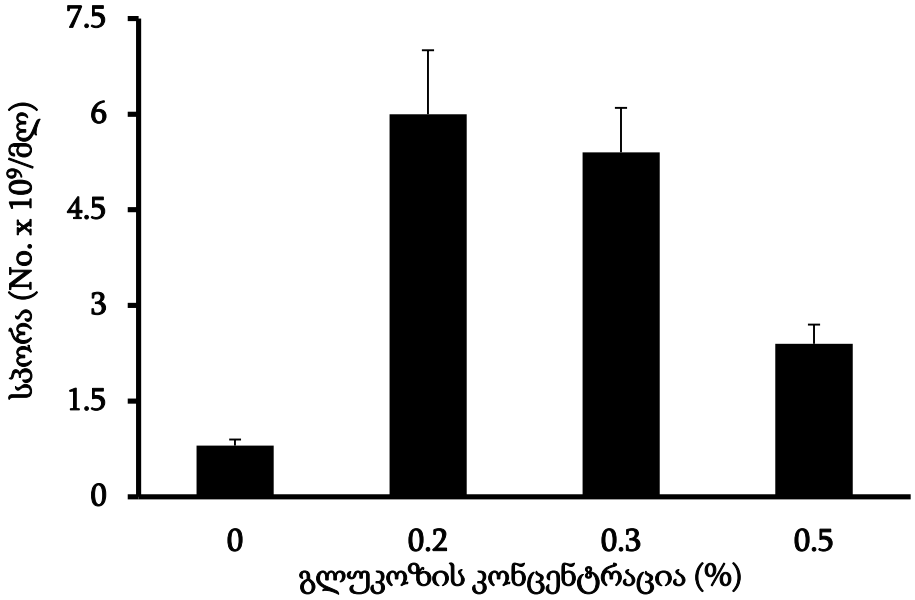
ბაქტერიების სპორების გამოსავლიანობამ მიაღწია მაქსიმუმს 48 საათში და შეადგინა 0.7 x 10^9 სპორა/მლ (ფიგურა 1).

ცხრილი 3. საკვები არის საბოლოო pH და მარედუცირებელი შაქრების კონცენტრაცია *B. subtilis* KATMIRA 1933-ს სიღრმული ფერმენტაციის დროს საკვებ არეში ნახშირბადის სხვადასხვა წყაროს თანაობისას

ნახშირბადის წყარო	საკვები არის pH	მარედუცირებელი შაქრები, მგ $მლ^{-1}$
კულტივირების დრო - 48 სთ		
კონტროლი	7.5	0
გლუკოზა	6.0	8.6
გლიცეროლი	5.7	0.1
საქაროზა	6.0	12.9
ქსილოზა	7.0	9.9
კულტივირების დრო - 72 სთ		
კონტროლი	7.5	0.03
გლუკოზა	6.0	2.1
გლიცეროლი	5.7	0.1
საქაროზა	6.3	10.1
ქსილოზა	7.2	7.6

საკონტროლო საკვებ არეში ნახშირბადის სხვადასხვა წყაროს 0.5% კონცენტრაციით დამატებამ განაპირობა სპორების გამოსავლიანობის მნიშვნელოვანი ზრდა, რომლის მაგნიტუდა დამოკიდებული იყო ნახშირბადის გამოყენებულ წყაროზე. სპორების ყველაზე მაღალი გამოსავლიანობა (2.3 x 10^9 სპორა/მლ) მიღებული იქნა ბაცილების სიღრმული კულტივირებისას, 72 საათის განმავლობაში, გლუკოზის შემცველ საკვებ არეში. საქაროზამ და ქსილოზამ, როგორც ნახშირბადის წყაროებმა, ასევე მნიშვნელოვანი როლი ითამაშეს სპორების ფორმირებაში. ხოლო, გლიცეროლი აღმოჩნდა ნახშირბადის ყველაზე ღარიბი წყარო *B. subtilis* KATMIRA

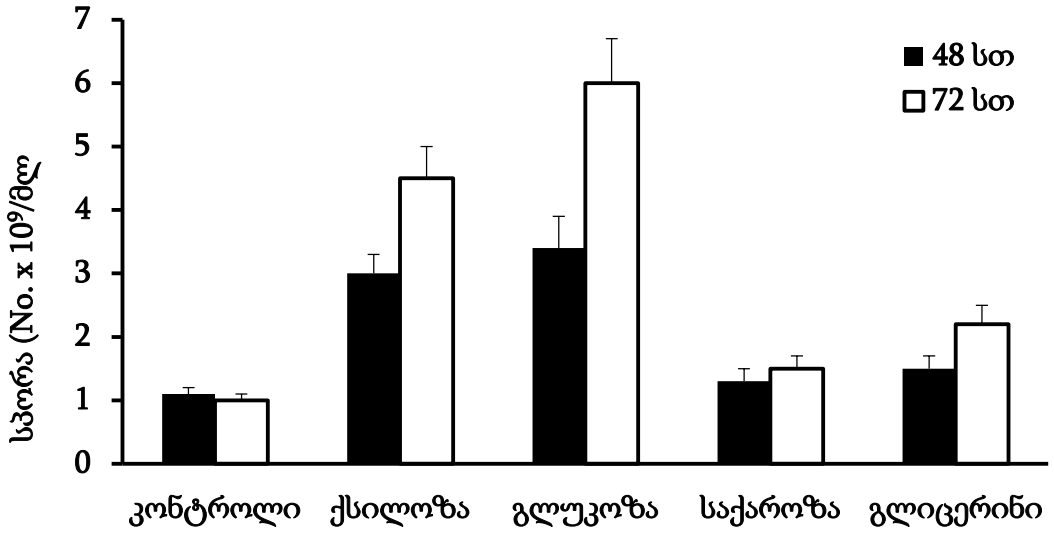
1933-სთვის, კერძოდ, ამ შემთხვევაში, სპორების რაოდენობით, საკონტროლო საკვებ არეს მხოლოდ ორჯერ აღემატებოდა. უნდა აღინიშნოს, რომ შაქრების შემცველ საკვებ არეში საბოლოო pH მერყეობდა 6.6-დან 7.2-მდე, მაშინ როდესაც გლიცეროლის შემცველი საკვები არის pH შემცირდა 5.8-მდე (ცხრილი 3). შესაძლებელია ითქვას, რომ გლიცერინიან არეში შედარებით დაბალმა pH-მა ხელი შეუშალა ბაქტერიების ზრდას და სპოროგენეზის პროცესს. აგრეთვე, მიღებული შედეგები გვიჩვენებენ, რომ საკონტროლო საკვებ არეში ნახშირბადის წყაროს დამატებამ შეაფერხა სპორების ფორმირება. შედეგად, სპორების მაქსიმალური გამოსავლიანობა შეიმჩნეოდა მხოლოდ 72 საათიანი კულტივირების შემდეგ. და ბოლოს, მე-4 ცხრილში მოყვანილი შედეგები ცხადყოფენ, რომ *B. subtilis* KATMIRA 1933-ის სამდღიანი კულტივირების შემდეგაც საქაროზა და ქსილოზა არ იყო ბოლომდე მეტაბოლიზირებული. შესაძლოა, შაქრების მაღალი კონცენტრაცია აინჰიბირებდა სპოროგენეზის ინიცირებას.



ფიგურა 2. გლუკოზის კონცენტრაციის გავლენა *B. subtilis* KATMIRA 1933-ს სპორების გამოსავლიანობაზე.

შემდგომში, შეფასებულ იქნა გლუკოზის კონცენტრაციის გავლენა პრობიოტიკების პროდუცირებაზე. მიღებულმა მონაცემებმა აჩვენა, რომ ნახშირბადის გამოყენებული წყაროს ყველაზე დაბალმა კონცენტრაციამაც კი 7-ჯერ გაზარდა სპორების გამოსავლიანობა საკონტროლო საკვებ არესთან შედარებით. ფაქტობრივად, სპორების მაქსიმალური რაოდენობა (6 x 10^9 სპორა/მლ) მიღწეულ იქნა საკვებ არეში გლუკოზის 0.2% კონცენტრაციისას (ფიგურა 2), მაშინ, როდესაც

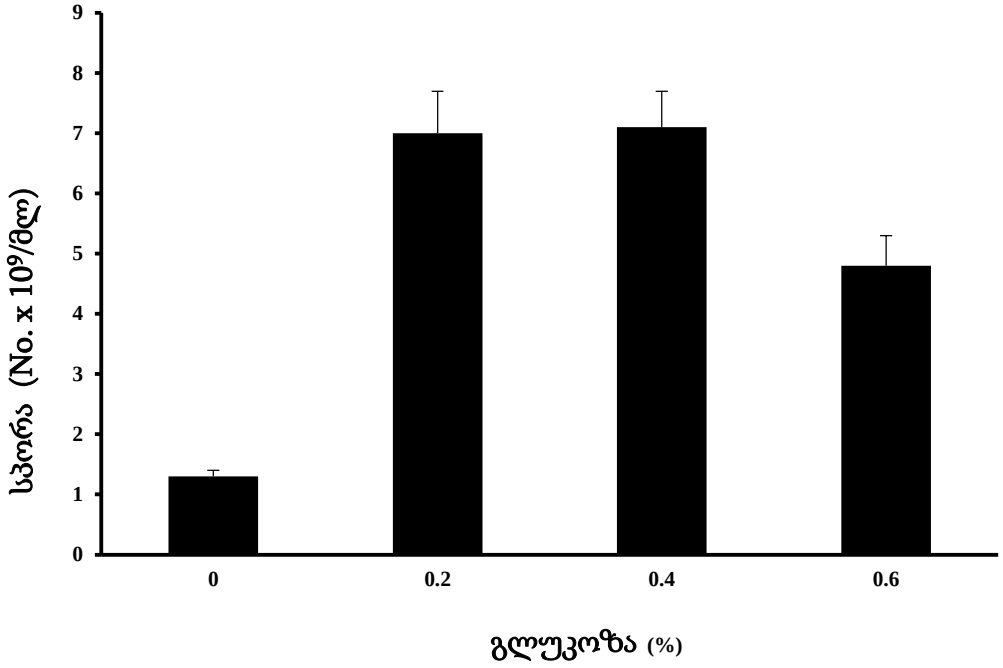
ნახშირბადის წყაროს კონცენტრაციის შემდგომ თანმიმდევრულ ზრდას თან ახლდა სპორების გამოსავლიანობის შემცირება.



ფიგურა 3. ნახშირბადის წყაროების გავლენა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს სპორების გამოსავლიანობაზე კულტივირების 48 და 72 საათის შემდეგ

აგრეთვე, შესწავლილი იქნა პრობიოტიკული ბაქტერიის *B. amyloliquefaciens* B-1895-ის სპორების ფორმირების უნარი სინთეზურ საკვებ არეში, ნახშირბადის სხვადასხვა წყაროზე დამოკიდებულებით. სიღრმული კულტივირებისას, საკონტროლო არე ნახშირბადის წყაროს გარეშე უზრუნველყოფდა ბაცილების ზრდას საფუარის ექსტრაქტისა და პეპტონის ხარჯზე და წარმოქმნა 1.1 x 10^9 სპორა/მლ (ფიგურა 3). საკონტროლო საკვებ არეში ნახშირბადის წყაროს დამატებამ 0.5% კონცენტრაციით ხელი შეუწყო ბაქტერიულ ზრდას და სპორების წარმოქმნას, თუმცა განსხვავებული ხარისხით. სპორების ყველაზე მაღალი გამოსავლიანობა (6 x 10^9) მიღწეული იქნა ბაცილების კულტივირების დროს, გლუკოზის შემცველ არეში, 72 საათის შემდეგ. ქსილოზა ასევე აღმოჩნდა ნახშირბადის სათანადო წყარო სპორების ფორმირებისათვის, მაშინ როცა არეში გლიცეროლის თანაობისას სპორების რაოდენობა შემცირებული იყო თითქმის 3-ჯერ. შემოწმებულ ნაერთებს შორის საქაროზა აღმოჩნდა ნახშირბადის ყველაზე ღარიბი წყარო *B. amyloliquefaciens* B-1895-სთვის, სავარაუდოდ, საქაროზის დაბალი აქტივობის გამო. უფრო მეტიც, შესაძლებელია დაბალი pH გლიცეროლისა და საქაროზის შემცველ საკვებ არეებში (შესაბამისად, 5.6 და 6.0) იყოს სპორულაციის დაბალი ეფექტურობის კიდევ ერთი

მიზეზი. საბოლოოდ, აღსანიშნავია, რომ საკონტროლო საკვებ არეში ნახშირბადის წყაროს დამატებამ გამოიწვია სპორების გამოსავლიანობის მაქსიმუმის ცვლა 48 საათიდან 72 საათამდე.



ფიგურა 4. გლუკოზის კონცენტრაციის გავლენა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს სპორების გამოსავლიანობაზე

შემდგომში, შესწავლილ იქნა გლუკოზის კონცენტრაციის ეფექტი პრობიოტიკების წარმოებაზე. მიღებულმა შედეგებმა ცხადყო, რომ ნახშირბადის წყაროს ყველაზე დაბალი კონცენტრაციაც კი (0.2%) 5-ჯერ ზრდის სპორების გამოსავლიანობას, საკონტროლო საკვებ არესთან შედარებით (ფიგურა 4). სპორების მაქსიმალური კონცენტრაცია (7.1 x 10^9) მიღწეული იქნა საკვებ არეში გლუკოზის 0.4% შემცველობისას. ნახშირბადის წყაროს კონცენტრაციის შემდგომმა გაზრდამ შეამცირა სპორების გამოსავლიანობა. მნიშვნელოვანია, აღინიშნოს, რომ კულტივირების დასასრულს გამოვლენილ იქნა გლუკოზის მთლიანი მოხმარება ყველა საკვებ არეში, გარდა გლუკოზის 0.6% შემცველ ვარიანტისა, სადაც ზრდის 72 საათის შემდეგ აღმოჩნდა მარედუცირებელი შაქრები 0.3 მგ/ლ-ზე რაოდენობით. შეიძლება ვივარაუდოთ, რომ ნახშირბადის წყაროს მოხმარება *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს სპოროგენეზისთვის მთავარი მასტიმულირებელი ფაქტორია. აქედან გამომდინარე,

საკვებ არეში გლუკოზის კონცენტრაციის შემცირება აუცილებელ პირობას წარმოადგენს სპორულაციის ეფექტიანობის ამაღლებისთვის.

4.1.2. ლიგნოცელულოზური ზრდის სუბსტრატის გავლენა *Bacillus* spp.-ს სპორების პროდუცირებაზე

პრობიოტიკების წარმოების ღირებულება შეიძლება შემცირდეს ორი მიდგომით - სპორების გამოსავლიანობის მნიშვნელოვანი გაზრდით და საკვები არის კომპონენტებად იაფი ნედლეულის გამოყენებით. ამ მიზნის მისაღწევად განხორციელებული კვლევებისთვის გამოყენებულ იქნა საქართველოში ადვილად ხელმისაწვდომი, აგროსასურსათო ინდუსტრიის საწარმოო ნარჩენები.

B. subtilis KATMIRA 1933-ს სპორების პროდუცირების შესაფასებლად სიღრმული ფერმენტაციისას, პირველად, პრობიოტიკების წარმოების ფიზიოლოგიის კვლევებში შესწავლილი იქნა ათი სხვადასხვა ქიმიური შემადგენლობის ლიგნოცელულოზური ნედლეული. ყველა ტესტირებული ნედლეული უზრუნველყოფდა ბაცილების კარგ ზრდას. მანდარინის, ბანანის ქერქის, სიმინდის კაჭეჭისა და მზესუმზირის კოპტონის გარდა, ფერმენტაცია მიმდინარეობდა pH-ის მნიშვნელოვანი ზრდით (ცხრილი 4). ტესტირებულ ზრდის სუბსტრატებს შორის მანდარინის ქერქმა, სიმინდის სპირტის წარმოების ნარჩენებმა უზრუნველყო სპორების მაღალი გამოსავლიანობა (71- და 37- ჯერ უფრო მაღალი გამოსავლიანობა, ვიდრე საკონტროლო საკვებ არეში ნახშირბადის წყაროს გარეშე). საინტერესოა, რომ ლიგნიფიცირებური ნედლეული - ხორბლის ნამჯა, ასევე აღმოჩნდა ხელსაყრელი სუბსტრატი *B. subtilis* KATMIRA 1933-ის კულტივირებისა და სპორების რაოდენობის ზრდისთვის (16.2 x 10^9 სპორა/მლ).

ცხრილი 4. ლიგნოცელულოზური ზრდის სუბსტრატის გავლენა *B. subtilis* KATMIRA 1933-ს სპორების პროდუცირებაზე

ზრდის სუბსტრატი	საბოლოო pH	მარედუცირებელი შაქრები, მგ/მლ	CMCაზა, ერთეული/მლ	სპორები No. x 10^9/მლ
კონტროლი	7.5 ± 0.1	0	0.2 ± 0.03	0.8 ± 0.1
ბანანის ქერქი	7.1 ± 0.1	0.1 ± 0.02	0.8 ± 0.13	6.3 ± 0.7
სიმინდის კაჭეჭი	7.2 ± 0.1	0.1 ± 0.02	0.4 ± 0.05	4.4 ± 0.6
სიმინდის სპირტის წარმოების ნარჩენი	7.8 ± 0.1	0.1 ± 0.03	0.4 ± 0.03	29.2 ± 4.9
ხორბლის სპირტის წარმოების ნარჩენი	8.2 ± 0.1	0.1 ± 0.02	0.3 ± 0.04	7.2 ± 0.5
მანდარინის ქერქი	6.9 ± 0.2	0.3 ± 0.05	1.0 ± 0.14	57.0 ± 8.1
სოია	8.6 ± 0.2	0	0.4 ± 0.03	0.8 ± 0.1
მზესუმზირას ექსტრაგირებული შროტი	8.0 ± 0.1	0	0.4 ± 0.02	1.3 ± 0.2
მზესუმზირას ზეთის შროტი	7.0 ± 0.1	0	0.2 ± 0.03	0.6 ± 0.1
ხორბლის ქატო	8.0 ± 0.1	0.1 ± 0.02	0.9 ± 0.11	6.1 ± 0.8
ხორბლის ნამჯა	8.6 ± 0.2	0	0.4 ± 0.06	16.2 ± 2.3

ამავე დროს, მზესუმზირას კოპტონი, სოია და მზესუმზირას შროტი აღმოჩნდა შედარებით ღარიბი სუბსტრატი ამ ბაქტერიის სპორულაციისთვის. საინტერესოა ისიც, რომ მარედუცირებელი შაქრების შემცველობა სიღრმული ფერმენტაციის დასრულებისას ყველა საკვებ არეში იყო დაბალი, რაც სავარაუდოდ გამოწვეული იყო ჰიდროლაზური ფერმენტების შედარებით დაბალი აქტივობით. მაგალითად, ცელულაზური აქტივობა მერყეობდა 0.2 ერთეულიდან/მლ მზესუმზირის კოპტონის საკვები არეში 0.9-1.0 ერთეულამდე/მლ ხორბლის ქატოს და მანდარინინს ქერქის შემცველ არეში (ცხრილი 4).

ცხრილი 5. მანდარინის ქერქის კონცენტრაციის გავლენა *B. subtilis* KATMIRA 1933-ს სპორების პროდუცირებაზე

სუბსტრატის კონცენტრაცია, გ/ლ	საბოლოო pH	მარედუცირებელი შაქრები, მგ/მლ	CMCაზა, ერთეული/მლ	სპორები, No. x 10^9/მლ
10.0	9.0 ± 0.1	0.1 ± 0.02	0.5 ± 0.04	6 ± 0.5
20.0	8.3 ± 0.2	0.2 ± 0.02	0.7 ± 0.07	19 ± 3.2
30.0	7.2 ± 0.1	0.3 ± 0.04	1.2 ± 0.20	41 ± 5.8
40.0	7.0 ± 0.1	0.4 ± 0.07	1.3 ± 0.16	61 ± 7.1
60.0	6.9 ± 0.2	1.1 ± 0.14	1.3 ± 0.21	34 ± 5.5

შემდგომ, დადგენილ იქნა მანდარინის ქერქის, როგორც ზრდის სუბსტრატის ოპტიმალური კონცენტრაცია *B. subtilis subsp.* KATMIRA 1933-ს სპორების მაქსიმალური პროდუცირებისთვის. მე-5 ცხრილში გამოსახული შედეგები ცხადყოფს, რომ საკვებ არეში მანდარინის ქერქის კონცენტრაციის ზრდამ გამოიწვია საბოლოო საკვები არის pH-ის შემცირება, ხოლო მარედუცირებელი შაქრების შემცველობა საგრძნობლად გაიზარდა. აღსანიშნავია, რომ *B. subtilis* KATMIRA 1933-ის ენდოგლუკონაზური აქტივობა კორელირდებოდა მანდარინის ქერქის კონცენტრაციასთან, CMCაზას მაქსიმალური აქტივობა გამოვლინდა ზრდის სუბსტრატის 4% კონცენტრაციისას.

მიღებულმა შედეგებმა აჩვენა, რომ საკვებ არეში მანდარინის ქერქის 10 გ/ლ შემცველობით *B. subtilis* KATMIRA 1933-ს სპორულაცია იყო 4 x 10^9 სპორა/მლ, ხოლო საკვებ არეში მანდარინის ქერქის 30 გ/ლ და 40 გ/ლ კონცენტრაციის შემთხვევაში, შესაბამისად, სპორების გამოსავლიანობა გაიზარდა 7 და 10-ჯერ. მანდარინის ქერქის კონცენტრაციის შემდგომმა ზრდამ ხელი არ შეუწყო სპორების ფორმირებას და 2-ჯერ შეამცირა სპორების კონცენტრაცია 72 საათიანი ფერმენტაციის შემდეგ. აღნიშნულიდან გამომდინარე, შემდგომ ექსპერიმენტებში *B. subtilis* KATMIRA 1933 -ის კულტივირების და სპორების პროდუცირებისთვის ზრდის სუბსტრატად გამოყენებულ იქნა მანდარინის ქერქი 40 გ/ლ კონცენტრაციით.

ცხრილი 6. ლიგნოცელულოზური ზრდის სუბსტრატის გავლენა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს სპორების პროდუცირებაზე

სუბსტრატი	საბოლოო pH	მარედუცირებელი შაქრები, მგ/მლ	CMCase, ერთეული/მლ	სპორები, No. x 10^9/მლ
ბანანის ქერქი	8.8 ± 0.1	0.3 ± 0.03	0.3 ± 0.03	2.4 ± 0.3
სიმინდის კაჭეჭი	8.0 ± 0.1	0.1 ± 0.02	0.4 ± 0.05	10.8 ± 0.8
სიმინდის სპირტის წარმოების ნარჩენი	8.3 ± 0.1	0.1 ± 0.02	0.4 ± 0.04	3.6 ± 0.3
ხორბლის სპირტის წარმოების ნარჩენი	9.0 ± 0.1	0.1 ± 0.01	0.4 ± 0.03	9.6 ± 0.6
მანდარინის ქერქი	6.8 ± 0.2	0.4 ± 0.03	0.7 ± 0.09	8.2 ± 0.8
სოია	9.0 ± 0.1	0.1 ± 0.02	0.3 ± 0.02	7.7 ± 0.5
მზესუმზირას ექსტრაგირებული შროტი	9.0 ± 0.1	0.1 ± 0.01	0.5 ± 0.04	8.9 ± 0.5
მზესუმზირას ზეთის შროტი	8.5 ± 0.1	0.1 ± 0.01	0.2 ± 0.03	3.6 ± 0.2
ხორბლის ქატო	9.0 ± 0.1	0.3 ± 0.02	0.3 ± 0.04	9.0 ± 0.6
ხორბლის ნამჯა	8.5 ± 0.1	0	0.2 ± 0.02	2.3 ± 0.2

B. amyloliquefaciens B-1895-ს სამდღიანმა სიღრმულმა კულტივირებამ გვიჩვენა, რომ ტესტირებულმა ყველა სუბსტრატმა ხელი შეუწყო ბაცილების ზრდას. მანდარინის ქერქის გარდა, მათი ფერმენტაცია მიმდინარეობდა საკვები არის pH-ს მნიშვნელოვანი ზრდის თანხლებით. ჩვენს მიერ შესწავლილი *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს შტამის პროდუქტიულობამ ლიგნოცელულოზური ნედლეულის სიღრმული ფერმენტაციის დროს შეადგინა 2.3 x 10^9 – 10.8 x 10^9 სპორა/მლ, რაც აშკარად მიუთითებს მის მაღალ სპორაწარმომქმნელ უნარზე სამრეწველო გამოყენებისთვის. ტესტირებულ ზრდის სუბსტრატებს შორის სიმინდის კაჭეჭმა და შემდეგ ხორბლის სპირტის წარმოების ნარჩენმა განაპირობა სპორების ყველაზე მაღალი გამოსავლიანობა (გლუკოზის შემცველ საკვებ არესთან შედარებით 1.5-ჯერ მეტი). აქვე, ბანანის ქერქი და ხორბლის ნამჯა აღმოჩნდა ზრდის ცუდი სუბსტრატი სპორების ფორმირებისთვის (ცხრილი 6). საინტერესოა, რომ *B. amyloliquefaciens* B-

1895-მა გამოავლინა შედარებით დაბალი ცელულაზური აქტივობა ზემოჩამოთვლილი ნედლეულის ფერმენტაციისას, თუმცა საკმარისად მაღალი, ვიდრე *B. subtilis*-ის MU S1 შტამმა (Sreena et al., 2016). მიუხედავად ამისა, ნათელია, რომ სხვა ნახშირწყლების თანაობისას, ბაქტერიულ კულტურას ის აშკარად უზრუნველყოფდა აუცილებელად მისაწოდებელი ნახშირბადის წყაროთი, თუმცა საკვებ არეებში მარედუცირებელი შაქრების შემცველობა აღწევდა 0-0.4 გ/ლ.

ცხრილი 7. ხორბლის სპირტის წარმოების ნარჩენების კონცენტრაციის გავლენა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს სპორების პროდუცირებაზე

სუბსტრატი,%	საბოლოო pH	მარედუცირებელი შაქრები, მგ/მლ	CMCაზა, ერთეული/მლ	სპორები, No. x 10^9/მლ
1.0	9.2 ± 0.1	0.1 ± 0.01	0.2 ± 0.03	3.2 ± 0.2
2.0	9.1 ± 0.1	0.1 ± 0.01	0.4 ± 0.03	6.5 ± 0.4
3.0	9.1 ± 0.1	0.3 ± 0.02	0.5 ± 0.04	7.6 ± 0.6
4.0	9.2 ± 0.1	0.3 ± 0.02	0.5 ± 0.05	9.1 ± 0.7
6.0	9.1 ± 0.1	0.4 ± 0.04	0.6 ± 0.04	6.8 ± 0.7

შემდგომი ექსპერიმენტისთვის, ზრდის სუბსტრატებად შეირჩა ხორბლის სპირტის წარმოების ნარჩენი და სიმინდის კაჭეჭი და შეფასებულ იქნა მათი კონცენტრაციის ზეგავლენა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს სპორების ფორმირებაზე. მიღებული შედეგების თანახმად, სპირტის წარმოების ნარჩენების ფერმენტაცია მიმდინარეობდა საკვები არის pH-ის მნიშვნელოვანი მომატებით, მაგრამ საბოლოო pH-ის სიდიდე სუსტად იყო დამოკიდებული სუბსტრატის კონცენტრაციაზე (ცხრილი 7). უნდა აღინიშნოს, რომ *B. subtilis* KATMIRA 1933-თან შედარებით *B. amyloliquefaciens* B-1895-მა გამოამჟღავნა შედარებით დაბალი ენდოგლუკანაზური აქტივობა, რაც სავარაუდოდ განპირობებული იყო ხსნადი შაქრების დაბალი კონცენტრაციით ფერმენტირებულ სუბსტრატში.

მე-7 ცხრილში წარდმოგენილი შედეგები აჩვენებენ, რომ როდესაც ზრდის სუბსტრატის კონცენტრაცია გაიზარდა 1%-დან 4%-მდე, ასევე თანდათან გაიზარდა

სპორების გამოსავლიანობა და სპორების რაოდენობამ სუბსტრატის 4%-იანი კონცენტრაციისას თითქმის 3-ჯერ გადააჭარბა სპორების რაოდენობას, ვიდრე ის იყო სუბსტრატის 1%-იანი კონცენტრაციის დროს. თუმცა, ლიგნოცელულოზის კონცენტრაციის შემდგომმა ზრდამ გამოიწვია სპორების პროდუცირების ინჰიბირება.

ცხრილი 8. სიმინდის კაჭეჭის კონცენტრაციის გავლენა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს სპორების პროდუცირებაზე

სუბსტრატი, % სიმინდის კაჭეჭი	საბოლოო pH	მარედუცირებელი შაქრები, მგ/მლ	CMCაზა, ერთეული/მლ	სპორები, No. x 10^9/მლ
1.0	8.1 ± 0.1	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01	4.3 ± 0.4
2.0	7.9 ± 0.1	0.1 ± 0.01	0.2 ± 0.03	7.3 ± 0.6
3.0	7.7 ± 0.1	0.2 ± 0.01	0.3 ± 0.04	11.0 ± 0.9
4.0	7.8 ± 0.1	0.3 ± 0.02	0.5 ± 0.04	11.6 ± 1.1
6.0	8.0 ± 0.1	0.4 ± 0.02	0.5 ± 0.05	10.3 ± 1.0

სპირტის წარმოების ნარჩენებთან შედარებით, სიმინდის კაჭეჭის ფერმენტაცია მიმდენარეობდა საკვები არის pH-ის უმნიშვნელო ზრდის თანხლებით, რამაც დადებითად იმოქმედა ბაქტერიული კულტურის ზრდა-განვითარებაზე; მაგრამ საბოლოო საკვები არის pH თითქმის არ იყო დამოკიდებული სუბსტრატის კონცენტრაციაზე (ცხრილი 8). როგორც სპირტის წარმოების ნარჩენების ფერმენტაციის დროს, *B. amyloliquefaciens* B-1895-მა გამოაჟღავნა დაბალი ენდოგლუკანაზური აქტივობა და ფერმენტირებულ სუბსტრატში შაქრები დაგროვდა დაბალი კონცენტრაციით. თუმცა, ორივე მაჩვენებელი თანდათან იზრდებოდა სუბსტრატის კონცენტრაციის პროპორციულად.

წინამდებარე შედეგები ცხადყოფენ, რომ სპირტის წარმოების ნარჩენებთან შედარებით, სიმინდის კაჭეჭის ფერმენტაცია უზრუნველყოფდა სპორების შედარებით უკეთეს გამოსავლიანობას. როდესაც ზრდის სუბსტრატის კონცენტრაცია გაიზარდა 1%-დან 3-4%-მდე, ასევე თანდათან გაიზარდა სპორების გამოსავლიანობა

და სპორების რაოდენობამ სუბსტრატის 4% კონცენტრაციისას თითქმის 3-ჯერ გადააჭარბა სპორების რაოდენობას, რომელიც გამოვლენილი იყო სუბსტრატის 1%-იანი კონცენტრაციისას. მაგრამ, მცენარეული სუბსტრატის კონცენტრაციის შემდგომმა ზრდამ გამოიწვია სპორების პროდუცირების შემცირება.

იმის გამო, რომ ტესტირებულ ორ სუბსტრატს შორის, სიმინდის კაჭეჭმა განაპირობა სპორების ყველაზე მაღალი გამოსავლიანობა, შემდგომ ექსპერიმენტებში *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს კულტივირებისთვის და სპორაწარმოებისთვის ზრდის სუბსტრატად გამოყენებულ იქნა სიმინდის კაჭეჭი 40 გ/ლ კონცენტრაციით.

4.1.3. აზოტის წყაროს გავლენა *Bacillus* spp.-ს სპორების პროდუცირებაზე

B. subtilis KATMIRA 1933 - ს სიღრმული კულტივირებისას შესწავლილი იქნა სხვადასხვა არაორგანული მარილი და ორგანული ნაერთი (20 მილიმოლი აზოტი), როგორც მანდარინის ქერქში არსებული აზოტისთვის აზოტის დამატებითი წყარო. მიღებულმა შედეგებმა გამოავლინა რამდენიმე ზოგადი მახასიათებელი (ცხრილი 9).

ცხრილი 9. აზოტის წყაროების გავლენა *B. subtilis* KATMIRA 1933-ს სპორების პროდუცირებაზე

აზოტის წყარო	საბოლოო pH	მარედუცირებელი შაქრები, მგ/მლ	CMCაზა, ერთეული/მლ	სპორები, No. x 10^9/მლ
კონტროლი	6.4 ± 0.1	0.2 ± 0.01	1.5 ± 0.2	23 ± 3.4
KNO_3	6.8 ± 0.2	0.6 ± 0.03	1.9 ± 0.3	39 ± 5.7
$(NH_4)_2SO_4$	5.7 ± 0.2	0.7 ± 0.07	0.9 ± 0.1	6 ± 1.0
NH_4NO_3	7.2 ± 0.1	0.3 ± 0.04	0.7 ± 0.1	29 ± 3.9
პეპტონი	7.1 ± 0.1	0.6 ± 0.05	1.0 ± 0.1	66 ± 8.8
საფუარის ექსტრაქტი	7.0 ± 0.1	0.6 ± 0.07	0.9 ± 0.2	31 ± 4.8
კაზეინის ჰიდროლიზატი	7.2 ± 0.1	0.5 ± 0.07	0.5 ± 0.1	20 ± 3.1

პირველი-საკონტროლო არეში ამონიუმის სულფატის დამატებამ ფერმენტაციისას გამოიწვია საკვები არის შემჟავება, მაშინ როდესაც აზოტის სხვა დანარჩენი წყაროს დამატებამ გამოიწვია საკვები არის pH-ის მომატება.

მეორე, როგორც მოსალოდნელი იყო, მანდარინის ქერქი აზოტის დამატებითი წყაროს გარეშე, დაგროვილი სპორების რაოდენობით (2.3 x 10^{10} სპორა/მლ) აღმოჩნდა ზრდის ოპტიმალური სუბსტრატი. *B. subtilis* KATMIRA 1933-ს ამ არეში კულტივირება ხელსაყრელი გამოდგა ენდოგლუკანაზას პროდუცირებისთვის. საკონტროლო საკვებ არეში მხოლოდ კალიუმის ნიტრატის დამატებამ აზოტის სხვა წყაროებთან შედარებით გამოიწვია ცელულაზური აქტივობის გაზრდა.

ცხრილი 10. აზოტის წყაროს კონცენტრაციის გავლენა *B. subtilis* KATMIRA 1933-ს სპორების პროდუცირებაზე

პეპტონის კონცენტრაცია, mM N	საბოლოო pH	მარედუცირებელი შაქრები, მგ/მლ	CMCაზა, ერთეული/მლ	სპორები, No. x 10^{10}/მლ
0	6.5 ± 0.1	0.3 ± 0.03	1.3 ± 0.2	2.0 ± 3.1
10	7.0 ± 0.1	0.5 ± 0.06	1.1 ± 0.2	3.6 ± 4.3
20	7.2 ± 0.1	0.4 ± 0.05	0.9 ± 0.1	6.1 ± 7.3
40	7.3 ± 0.1	0.2 ± 0.03	0.8 ± 0.1	8.3 ± 10.6
80	8.0 ± 0.1	0.2 ± 0.03	0.5 ± 0.1	4.2 ± 6.0

მესამე, ბაცილების კულტივირების დროს სპორების გამოსავლიანობა ვარირებდა დიდი დიაპაზონით, აზოტის წყაროზე დამოკიდებულებით. არაორგანულ ნაერთებს შორის KNO_3 აღმოჩნდა აზოტის საუკეთესო წყარო, რომელმაც განაპირობა სპორების რაოდენობის 2-ჯერ გაზრდა, კონტროლთან შედარებით. ამავე დროს, საკონტროლო საკვებ არეში ამონიუმის სულფატის დამატებამ მკვეთრად შეაჩერა სპორულაციის პროცესი და 4-ჯერ შეამცირა სპორების გამოსავლიანობა კონტროლთან შედარებით. აღნიშნულისგან განსხვავებით, აზოტის ყველა ორგანული წყარო აღმოჩნდა სათანადო *B. subtilis* KATMIRA 1933 - ს მანდარინის ქერქის სიღრმული ფერმენტაციისას. მათ შორის, პეპტონმა უზრუნველყო სპორების

ყველაზე დიდი ოდენობით დაგროვება - 6.6 x 10^{10} სპორა/მლ და სპორების რაოდენობამ თითქმის 3-ჯერ გადააჭარბა საკონტროლო საკვებ არეში სპორების რაოდენობას.

B. subtilis KATMIRA 1933-ს კულტივირების დროს საკვებ არეში აზოტის კონცენტრაციის თანდათანობით 0-დან 40 მილიმოლამდე მომატებასთან ერთად პროდუცირებული სპორების რაოდენობა გაიზარდა 2.0 x 10^{10}-დან 8.3 x 10^{10}-მდე სპორა/მლ (ცხრილი 10). შემდგომში, აზოტის წყაროს კონცენტრაციის მომატებამ 80 მილიმოლამდე შეამცირა სპორების გამოსავლიანობა, თუმცა მანდარინის ქერქის 72 საათიანი სიღრმული ფერმენტაციის შემდეგ სპორების რაოდენობა მაინც გაიზარდა 2-ჯერ, საკონტროლო საკვებ არესთან შედარებით. მიუხედავად ამისა, უნდა აღინიშნოს, რომ *B. subtilis* KATMIRA 1933-ის მიერ მანდარინის ქერქის სიღრმულმა ფერმენტაციამ პეპტონის ყველაზე მაღალი კონცენტრაციით თანაობისას აშკარად შეაჩერა ბაქტერიული კულტურის ზრდა-განვითარება და სპორულაციის პროცესი. შესაძლებელია ვივარაუდოთ, რომ ბაქტერიული კულტურის ასეთი რეაქცია განაპირობებული იყო საკვები არის შედარებით მაღალი pH-ით და ჰიდროლაზური ფერმენტების საკმაოდ დაბალი აქტივობით და აქედან გამომდინარე, ნახშირბადის წყაროს ლიმიტირებით. აშკარად, ენდოგლუკანაზის აქტივობის გაზომვამ ნათლად აჩვენა, რომ აზოტის მომატებამ 0-დან 80 მილიმოლამდე შეამცირა უჯრედგარე ფერმენტების აქტივობა 1.3-დან 0.5 ერთ/მლ-მდე.

ცხრილი 11. აზოტის წყაროების გავლენა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს სპორების პროდუცირებაზე

აზოტის წყარო	საბოლოო pH	მარედუცირებელი შაქრები, მგ/მლ	CMCაზა, ერთეული/მლ	სპორები, No. x 10^{10}/მლ
კონტროლი	7.0 ± 0.1	0.2 ± 0.01	0.24 ± 0.03	0.72 ± 0.9
KNO_3	8.4 ± 0.1	0.1 ± 0.01	0.44 ± 0.06	2.34 ± 2.7
$(NH_4)_2SO_4$	6.5 ± 0.2	0.3 ± 0.02	0.55 ± 0.04	0.53 ± 0.8
NH_4NO_3	8.0 ± 0.1	0.1 ± 0.02	0.43 ± 0.05	0.7 ± 0.7
პეპტონი	7.7 ± 0.1	0.1 ± 0.01	0.52 ± 0.04	1.07 ± 1.2
საფუარის ექსტრაქტი	7.2 ± 0.1	0.2 ± 0.01	0.41 ± 0.04	1.5 ± 2.0
კაზეინის ჰიდროლიზატი	7.0 ± 0.1	0.1 ± 0.01	0.51 ± 0.05	2.03 ± 2.1

ასევე, გამოვლინდა აზოტის დამატებითი წყაროს როლი *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს სპოროგენეზის პროცესში, სიმინდის კაჭეჭის სიღრმული ფერმენტაციის დროს. მიღებულმა შედეგებმა აჩვენა რამდენიმე საერთო თავისებურება (ცხრილი 11). პირველი, სუბსტრატის ფერმენტაციამ ამონიუმის სულფატის თანაობით გამოიწვია საკვები არის ზომიერი შემჟავება, მაშინ როდესაც საკონტროლო საკვებ არეში KNO_3-ის, NH_4NO_3-ის და პეპტონის დამატებამ ფერმენტაციის დასასრულისთვის გამოიწვია pH-ის მომატება. მეორე, სიმინდის კაჭეჭი აზოტის დამატებითი წყაროს გარეშე აღმოჩნდა ზრდის საუკეთესო სუბტრატი, რომელმაც განაპირობა სპორების მნიშვნელოვანი დაგროვება - 0.72 x 10^{10} სპორა/მლ-ზე. მესამე, ბაცილების ზრდის დროს, აზოტის სხვადსხვა წყაროს მიწოდებისას, *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს სპორების გამოსავლიანობა ვარირებდა ფართო სპექტრით. ზოგადად, საკვებ არეში აზოტის ორგანული წყაროს დამატება განაპირობებდა სპორების გამოსავლიანობის ზრდას. მათ შორის, საკონტროლო საკვებ არესთან შედარებით, კაზეინის ჰიდროლიზატმა მოგვცა სპორების გამოსავლიანობის 3-ჯერ გაზრდა. არაორგანულ კომპონენტებს შორის, ამონიუმის სულფატმა და ამონიუმის ნიტრატმა მოახდინა

სპორულაციის პროცესის ინჰიბირება, ამავდროულად, აზოტის საუკეთესო წყარო აღმოჩნდა KNO_3, რამაც უზრუნველყო სპორების გამოსავლინობის 3-ზე მეტჯერ გაზრდა.

ცხრილი 12. კაზეინის ჰიდროლიზატის კონცენტრაციის გავლენა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს სპორების პროდუცირებაზე

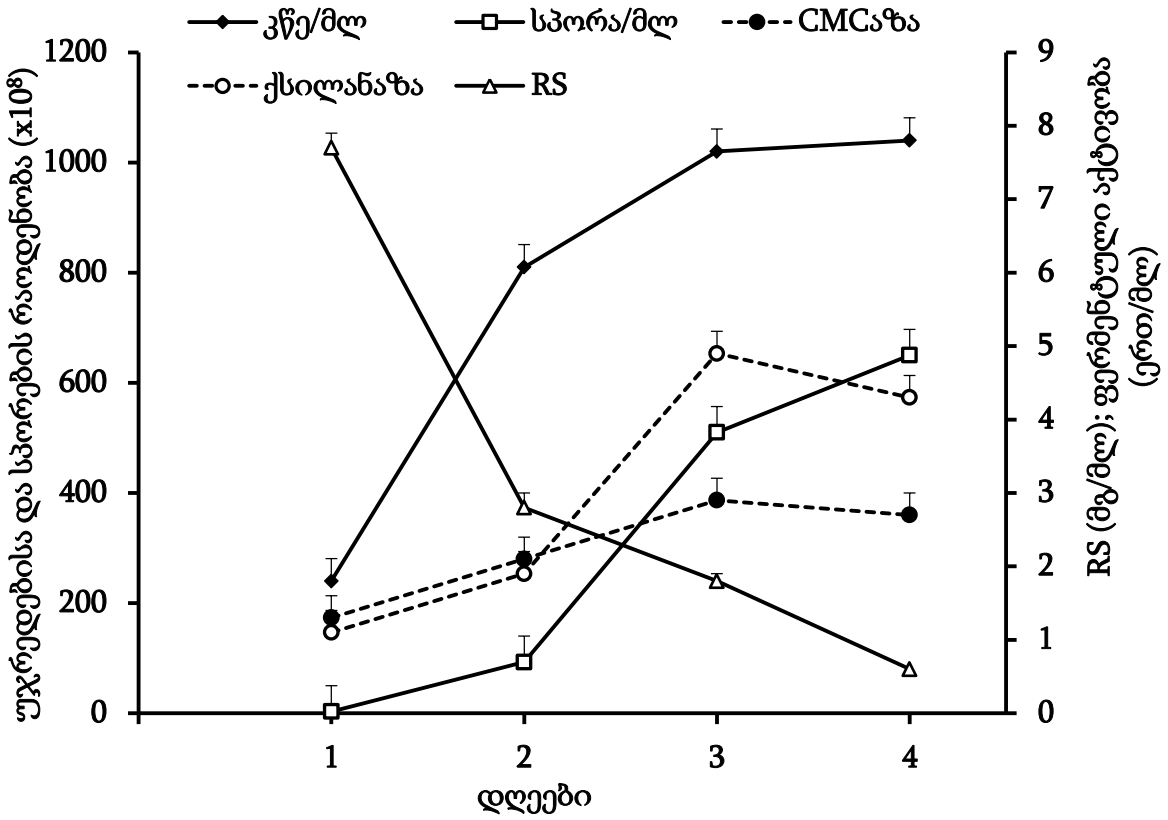
აზოტი, mM	საბოლოო pH	მარედუცირებელი შაქრები, მგ/მლ	CMCაზა, ერთეული/მლ	სპორები, No. x 10^{10}/მლ
0	7.0 ± 0.1	0.2 ± 0.01	0.21 ± 0.03	0.52 ± 0.4
10	7.0 ± 0.1	0.2 ± 0.01	0.28 ± 0.03	0.79 ± 0.8
20	7.0 ± 0.1	0.2 ± 0.02	0.46 ± 0.05	1.67 ± 2.0
40	7.3 ± 0.1	0.2 ± 0.01	0.47 ± 0.05	2.80 ± 3.2
80	8.0 ± 0.1	0.2 ± 0.02	0.42 ± 0.06	0.31 ± 0.5

ასევე, შესწავლილი იქნა კაზეინის ჰიდროლიზატის კონცენტრაციის გავლენა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს სპოროგენეზის პროცესზე, სიმინდის კაჭეჭის სიღრმული ფერმენტაციის დროს. საკვებ არეში აზოტის კონცენტრაციის თანდათანობით მომატებამ 0-დან 40 მილიმოლამდე სპორაწარმოქმნა გაზარდა 0.52 x 10^{10}-დან 2.8 x 10^{10} სპორა/მლ-მდე (ცხრილი 12). შემდგომში, აზოტის წყაროს მომატებამ 80 მილიმოლამდე მკვეთრად შეამცირა ბაქტერიული კულტურის განვითარება და სპორულაციის პროცესი, სიმინდის კაჭეჭის 72 საათიანი სიღრმული ფერმენტაციის შემდეგ და სპორების გამოსავლიანობაც იყო უფრო დაბალი, ვიდრე საკვებ არეში, დამატებითი აზოტის გარეშე. აღსანიშნავია, რომ ყველა საკვებ არეში მარედუცირებელი შაქრების შემცველობა იყო თანაბარი, განსხვავებით pH-სგან, რომელიც კაზეინის ჰიდროლიზატის უმაღლესი კონცენტრაციისას იყო მნიშვნელოვნად მაღალი, ვიდრე სხვა საკვებ არეებში. ენდოგლუკანაზური აქტივობის შეფასებამ აჩვენა, რომ აზოტის შემცველობის მომატებამ 0-დან 20 მილიმოლამდე ხელი შეუწყო ცელულაზას უჯრედგარე აქტივობის აკუმულაციას.

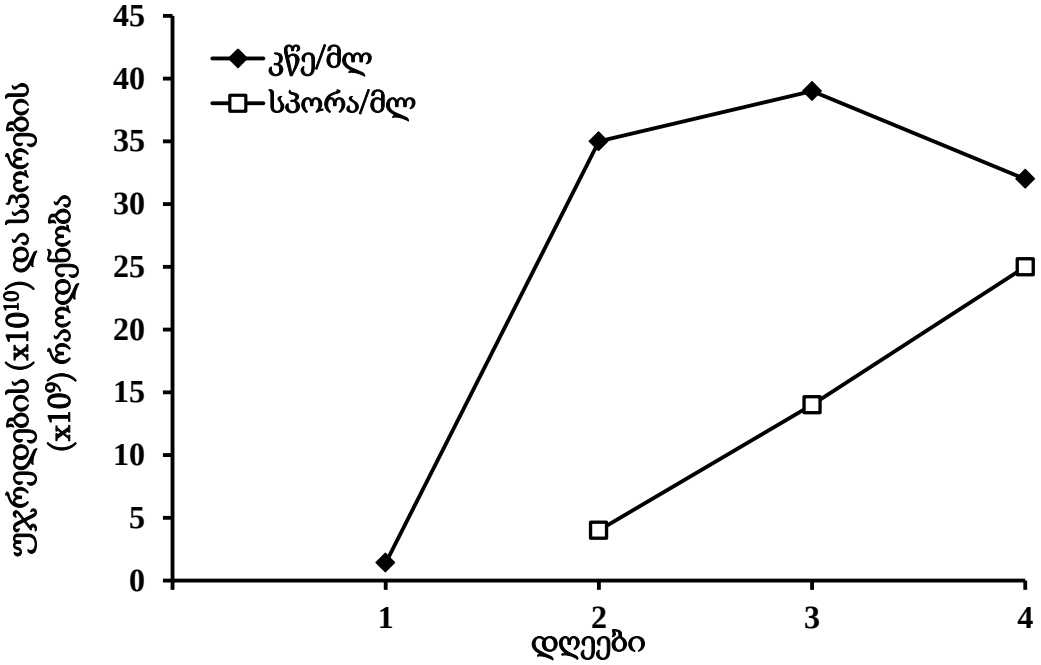
4.1.4. *B. subtilis* KATMIRA 1933-სა და *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს კულტივირება ფერმენტიორში

პრობიოტიკების წარმოების პროცესის მასშტაბირებისთვის განხორციელდა *B. subtilis* KATMIRA 1933-ს კულტივირება ფერმენტიორში, ოპტიმიზებული საკვები არის გამოყენებით.

ფერმენტაციის განმავლობაში, ფერმენტიორის ბრუნების სიჩქარე (300 ბრ/წთ) და აერაციის სიჩქარე (1.0 ლ/ლ/წთ) იყო უცვლელი. აღნიშნული პირობების გამოყენებამ ხელი შეუშალა ბექტერიული უჯრედების დალექვას და უზრუნველყო საკვები კომპონენტებისა და დისპერსიული ჰაერის მიწოდება. მიუხედავად ამისა, 24 საათის შემდგომ, ჟანგბადის შედარებითი კონცენტრაცია შემცირდა 5%-მდე, ხოლო ფერმენტაციის მე-3 დღეს გაიზარდა 13%-მდე. მიღებულმა შედეგებმა აჩვენა, რომ ბაქტერიის გამრავლება მოხდა სწრაფად, სიღრმული ფერმენტაციის დასაწყისიდან 24 საათიანი კულტივირების შემდეგ, ვეგეტატური უჯრედების რაოდენობა გაიზარდა 3 x 10^6-დან 2.4 x 10^{10} კწე/მლ (ფიგურა 5), ამავე დროს, სპორების რაოდენობა იყო დაბალი, მხოლოდ 3 x 10^8 სპორა/მლ. ფერმენტაციის მეორე დღის განმავლობაში ვეგეტატური უჯრედების რაოდენობა გაიზარდა 3.5-ჯერ - 8.1 x 10^{10} კწე/მლ-მდე, ხოლო სპორების რაოდენობა 30-ჯერ - 9.3 x 10^9 სპორა/მლ. შემდგომი კულტივირებისას, *B. subtilis* KATMIRA 1933-ის ვეგეტატური უჯრედების რაოდენობა გაიზარდა შედარებით მცირედით, კერძოდ, 72 საათის შემდეგ 10.2 x 10^{10} კწე/მლ-მდე, ხოლო 96 საათის შემდეგ 10.4 x 10^{10} კწე/მლ-მდე. განსხვავებით აღნიშნულისგან, სპორების რაოდენობა გაიზარდა გაცილებით სწრაფად, მაქსიმალური გამოსავლიანობით 6.5 x 10^{10} სპორა/მლ, ფერმენტაციის 96 საათის შემდეგ. საინტერესოა, რომ ბაქტერიების კულტივირებისას, მარედუცირებელი შაქრების შემცველობა საკვებ არეში მუდმივად მცირდებოდა: 7.7 მგ/მლ-დან პირველ დღეს, 0.6 მგ/მლ-მდე მეოთხე დღეს. ამავდროულად, *B. subtilis* KATMIRA 1933-ს აღმოაჩნდა შედარებით ძლიერი ენდოგლუკანაზური და ქსილანაზური აქტივობის პროდუცენტი, მანდარინის ქერქის სამდღიანი ფერმენტაციის დროს.



ფიგურა 5. ვეგეტატური უჯრედებისა და სპორების რაოდენობის, ცელულაზისა და ქსილანაზას აქტივობის კინეტიკა *B. subtilis* KATMIRA 1933-ს ფერმენტიორში კულტივირების დროს



ფიგურა 6. ვეგეტატური უჯრედებისა და სპორების რაოდენობის კინეტიკა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს ფერმენტიორში კულტივირების დროს.

გარკვეული განსხვავებები იქნა გამოვლენილი მეორე პრობიოტიკული ბაქტერიის *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს ფერმენტიორში კულტივირების დროს. მთელი პერიოდის განმავლობაში ბრუნების სიჩქარე იყო მუდმივი (250 ბრუნი/წთ), მაშინ როდესაც პირველ დღეს აერაციის დონე იყო 0.5 ლ/ლ/წთ, ხოლო შემდგომ გაიზარდა 1.0 ლ/ლ/წთ-მდე. ამ პირობებმა შექმნა ბაქტერიული უჯრედების შერევის ოპტიმალური პირობები და უზრუნველყო საკვებისა და ჰაერის საკმარისი დისპერსია. მიღებულმა შედეგებმა ცხადყო, რომ სიღრმული ფერმენტაციის პირველ 24 საათში ბაცილების ზრდა მოხდა ძალიან სწრაფად და ვეგეტატური უჯრედების რაოდენობა გაიზარდა 2 x 10^6 კწე/მლ-დან 1.4 x 10^{10} კწე/მლ-მდე (ფიგურა 6). თუმცა, უნდა აღინიშნოს, რომ სპორების პროდუცირება ამ დროს საერთოდ არ შეინიშნებოდა. ფერმენტაციის მეორე დღის განმავლობაში ვეგეტატური უჯრედების რაოდენობა გაიზარდა 3.5 x 10^{10} კწე/მლ-მდე, ხოლო 48 საათის შემდგომ სპორების რაოდენობამ მიაღწია 4 x 10^9 სპორა/მლ-ს. *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895-ს შემდგომი კულტივირებისას, უჯრედების რაოდენობა უმნიშვნელოდ გაიზარდა 3.9 x 10^{10} კწე/მლ-მდე 72 საათის შემდეგ და შემცირდა 3.2 x 10^{10} კწე/მლ-მდე 96 საათის შემდეგ. აღნიშნულისგან განსხვავებით, სპორების რაოდენობა მაქსიმალურ გამოსავლიანობამდე გაიზარდა მეოთხე დღეს (2.5 x 10^{10} სპორა/მლ). აქედან გამომდინარე, სპორულაციის ეფექტიანობა 48 საათიანი კულტივირების შემდეგ იყო 1.1% და 4 დღიანი ფერმენტაციის შემდეგ გაიზარდა 7.8%-მდე. როგორც ჩანს, შესაძლებელია ტესტირებული *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს სპორულაციის დონის გაუმჯობესება. ამიტომ, ფერმენტიორში სპორების გამოსავლიანობის გასაზრდელად უნდა განხორციელდეს დამატებითი კვლევები.

4.2. *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895-ს პრობიოტიკების წარმოების ფიზიოლოგიური თავისებურების დადგენა ლიგნოცელულოზური ნედლეულის მყარფაზოვანი ფერმენტაციის დროს

ცნობილია, რომ სიღრმულ ფერმენტაციასთან შედარებით, მყარფაზოვან ფერმენტაციას აქვს რიგი ბიოტექნოლოგიური უპირატესობები, კერძოდ, პროცესი მარტივია და არ საჭიროებს დიდ ინვესტიციას, რადგან გამოირჩევა ენერგიის დაბალი მოხმარებით, ზრდის სუბსტრატად გამოიყენება იაფი მცენარეული ნედლეული და

მყარფაზოვანი ფერმენტაციით მიღებული პროდუქტის ლიოფილიზაცია შესაძლებელია ცენტრიფუგირების გარეშე. გარდა ამისა, ეს პროცესი უზრუნველყოფს ფერმენტაციის უფრო მაღალ პროდუქტიულობას და მიღებული პროდუქტების უფრო მაღალ კონცენტრაციას. სწორედ ამიტომ, სპორაწარმომქმნელი პრობიოტიკების წარმოების იაფი და კონკურენტუნარიანი ტექნოლოგიის შესამუშავებლად, განხორციელებული კვლევების ერთ-ერთ მიზანს წარმოადგენდა განახლებადი და ადვილად ხელმისაწვდომი აგროინდუსტრიული ლიგნოცელულოზური ბიომასის მყარფაზოვანი ფერმენტაციის დროს *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს კულტივირების პირობების შესწავლა, სპორების ფორმირების გასაუმჯობესებლად.

4.2.1. ლიგნოცელულოზური ზრდის სუბსტრატის გავლენა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს პრობიოტიკების წარმოებაზე მყარფაზოვანი ფერმენტაციის დროს

წინასწარ ექსპერიმენტში შესწავლილ იქნა სიცოცხლისუნარიანი უჯრედებისა და ენდოსპორების დაგროვების პროცესი ეთანოლის წარმოების ნარჩენების მყარფაზოვანი ფერმენტაციის დროს. ვეგეტატური უჯრედებისა და სპორების რაოდენობამ აჩვენა, რომ უჯრედების მაქსიმალური კონცენტრაცია მიღწეულ იქნა ზრდის ორი დღის შემდეგ, ხოლო მაქსიმალური სპორულაცია - 4 დღის შემდეგ. ამიტომ, შემდგომ ექსპერიმენტებში მყარფაზოვანი ფერმენტაციის ხანძლივობა იყო 4 დღე. ზრდის სუბსტრატებს შორის სპორების ყველაზე მაღალი გამოსავლიანობა მოგვცა სიმინდის კაჭეჭისა და ეთანოლის წარმოების ნარჩენების მყაფაზოვანმა ფერმენტაციამ (შესაბამისად, 4.7 და 3.87 x 10^{11} სპორა/გ ბიომასაზე). ლიგნინშემცველი ნედლეული - ხორბლის ნამჯა, ასევე აღმოჩნდა ზრდის კარგი სუბსტრატი, პროდუქტიულობით - 3.1 x 10^{11} სპორა/გ. ამავე დროს, სოკოს წარმოების შემდეგ მიღებული ნარჩენი და მზესუმზირის შროტი გამოდგა სპოროგენეზისთვის შედარებით ღარიბი სუბსტრატი, შესაბამისად, სპორების 5-ჯერ და 12-ჯერ დაბალი გამოსავლიანობით (ცხრილი 13).

ცხრილი 13. მცენარეული ზრდის სუბსტრატის გავლენა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს სპორაწარმოქმნაზე და ფერმენტულ აქტივობაზე

ზრდის სუბსტრატები	საბოლოო pH	მარედუცირებელი შაქრები მგ g^{-1}	CMCაზა ერთეული g^{-1}	ქსილანაზა ერთეული g^{-1}	სპორები No. x 10^{11} g^{-1}
სიმინდის კაჭეჭი	7.0 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.1	6.6 ± 0.5	4.7 ± 5
ეთილის სპირტის წარმოების ნარჩენები	8.0 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.7 ± 0.1	4.6 ± 0.5	3.8 ± 6
მანდარინის ქერქი	7.0 ± 0.2	1.8 ± 0.2	1.2 ± 0.2	5.4 ± 0.8	2.6 ± 4
სოკოს SS	6.2 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1	5.2 ± 0.5	0.4 ± 1
სოია	7.3 ± 0.2	1.1 ± 0.1	1.9 ± 0.2	10.1 ± 1.3	2.3 ± 4
მზესუმზირას ზეთის ფქვილი	6.5 ± 0.1	2.3 ± 0.2	1.7 ± 0.2	10.2 ± 1.7	0.9 ± 2
ხორბლის ქატო	7.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1	2.7 ± 0.3	16.2 ± 2.0	1.9 ± 3
ხორბლის ნამჯა	7.1 ± 0.1	0.7 ± 0.1	2.5 ± 0.2	11.8 ± 1.3	3.1 ± 5

საინტერესოა, რომ ყველა საკვებ არეში მარედუცირებელი შაქრების შემცველობა მყარფაზოვანი ფერმენტაციის დასასრულისთვის იყო დაბალი, თუმცა ენდოგლუკანაზური და ქსილანაზური აქტივობა იყო შედარებით მაღალი, განსაკუთრებით ხორბლის ქატოსა და ნამჯის შემცველ საკვებ არეებში (ცხრილი 13).

ცხრილი 14. სუბსტრატის რაოდენობისა და ფენის სიმაღლის გავლენა სპორების დაგროვებაზე *B. amyloliquefaciens* B-1895-ით სიმინდის კაჭეჭის მყარფაზოვანი ფერმენტაციის პირობებში

სუბსტრატის რაოდენობა კოლბაში (გ)	არის საბოლოო pH-ი	დამატებული საკვები არის ოდენობა, მლ	სპორების რაოდენობა/გ სუბსტრატზე
5	8.0	20	$1.4 \cdot 10^{11}$
10	8.0	40	$2.6 \cdot 10^{11}$
15	8.0	60	$4.8 \cdot 10^{11}$
20	8.0	80	$1.5 \cdot 10^{11}$

ცალკე ექსპერიმენტში შესწავლილი იქნა ბაცილების მიერ სპორების ფორმირება, ზრდის სუბსტრატის რაოდენობასა და ფენაზე დამოკიდებულებით. კოლბები შეიცავდნენ 5, 10, 15 და 20 გ დაფქულ სიმინდის კაჭეჭს და ფენის სიმაღლეც, შესაბამისად, იყო 1, 2, 3 და 4 სანტიმეტრი. მყარფაზოვანი ფერმენტაციის 4 დღის შემდეგ, სუბსტრატის რაოდენობის 5-დან 15 გ-მდე ზრდისას სპორების გამოსავლიანობა გაიზარდა 1.4-დან 4.8 x 10^{11} სპორა/გ ბიომასაზე (ცხრილი 14). თუმცა, სიმინდის კაჭეჭის რაოდენობის ზრდამ 20 გრამამდე სპორების ფორმირებაზე იქონია უარყოფითი გავლენა. ამდენად, *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს კულტივირებისა და სპორაწარმოებისთვის, შემდგომი ექსპერიმენტებისას გამოყენებულ იქნა 60 მლ საკვები არით დატენიანებული 15 გ სიმინდის კაჭეჭი.

4.2.2. აზოტის წყაროს გავლენა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს პრობიოტიკების წარმოებაზე მყარფაზოვანი ფერმენტაციის დროს

ტესტირებული იქნა რამდენიმე არაორგანული მარილი და ორგანული ნაერთი, როგორც სიმინდის კაჭეჭის აზოტის დამატებითი წყარო (არეში აზოტის კონცენტრაცია - 100 მილიმოლი). მიღებულმა შედეგებმა აჩვენა რამდენიმე საერთო თავისებურება (ცხრილი 15).

პირველი, სუბსტრატის ფერმენტაციამ ამონიუმის სულფატის თანაობით გამოიწვია საკვები არის ზომიერი შემჟავება, მაშინ როდესაც, საკონტროლო საკვებ არეში აზოტის სხვა წყაროების დამატებამ ფერმენტაციის დასასრულისთვის გამოიწვია საკვები არის pH-ის მცირედით მომატება.

მეორე - სიმინდის კაჭეჭი, აზოტის დამატებითი წყაროს გარეშე იყო ზრდის შესაბამისი სუბსტრატი, რომელმაც განაპირობა სპორების მაღალი გამოსავლიანობა - 0.9 x 10^{11}/გ ბიომასაზე. უნდა აღინიშნოს, რომ ამ საკვებ არეში კულტივირებამ უზრუნველყო ენდოგლუკანაზისა და ქსილანაზის ეფექტიანი პროდუცირება. საკონტროლო საკვებ არეში კაზეინის ჰიდროლიზატისა და საფუარის ექსტრაქტის დამატებამ გამოიწვია უჯრედგარე ფერმენტების აქტივობის გაზრდა, მაშინ როდესაც KNO_3 - მა და პეპტონმა შეამცირა ფერმენტების სეკრეცია.

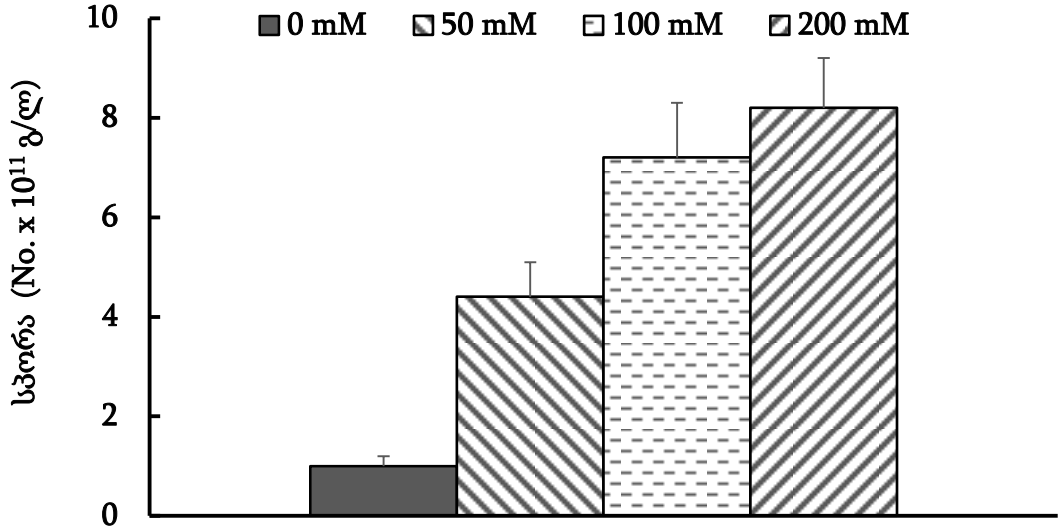
მესამე - სპორების გამოსავლიანობა მკვეთრად ვარირებდა აზოტის სხვადასხვა წყაროს დამოკიდებულებით. არაორგანულ ნაერთებს შორის, საკონტროლო საკვებ არესთან შედარებით, ამონიუმის სულფატმა ხელი შეუწყო სპორების რაოდენობის 2-ჯერ მომატებას.

ცხრილი 15. აზოტის წყაროს გავლენა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს სპორების დაგროვებაზე სიმინდის კაჭეჭის მყარფაზოვანი ფერმენტაციის დროს

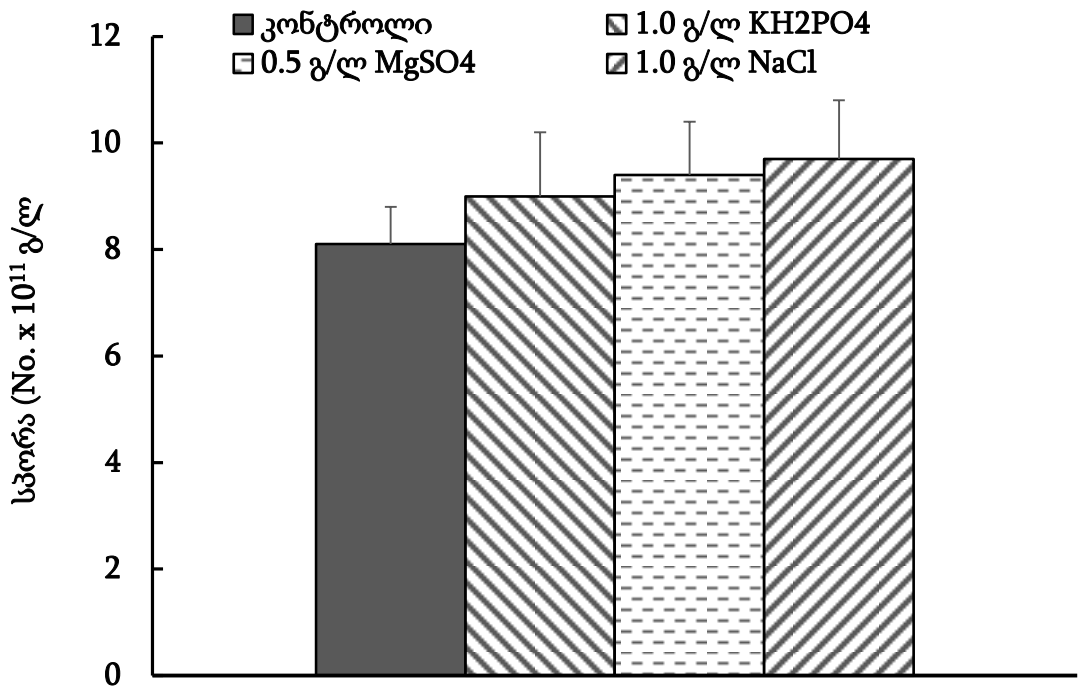
აზოტის წყარო	საბოლოო pH	მარედუცირებელი შაქრები მგ $г^{-1}$	CMCაზა ერთეული $г^{-1}$	ქსილანაზა ერთეული $г^{-1}$	სპორები No. x 10^{11} $г^{-1}$
კონტროლი	6.5 ± 0.1	3.9 ± 0.6	2.1 ± 0.2	6.5 ± 0.8	0.9 ± 2
KNO_3	7.3 ± 0.2	1.2 ± 0.2	0.7 ± 0.1	4.1 ± 0.5	1.5 ± 3
$(NH_4)_2SO_4$	6.7 ± 0.1	1.7 ± 0.2	1.3 ± 0.2	11.5 ± 1.3	1.7 ± 2
კაზეინის ჰიდროლიზატი	7.2 ± 0.1	1.2 ± 0.2	2.7 ± 0.4	13.2 ± 1.8	4.6 ± 7
პეპტონი	7.1 ± 0.1	1.1 ± 0.2	1.0 ± 0.2	5.3 ± 0.7	7.2 ± 9
საფუარის ექსტრაქტი	7.2 ± 0.1	0.9 ± 0.2	3.0 ± 0.3	12.4 ± 1.5	5.5 ± 5

საინტერესოა ასევე აღინიშნოს, რომ *B. amyloliquefaciens* B-1895-ით სიმინდის კაჭეჭის მყარფაზოვანი ფერმენტაციისას, აზოტის ორგანული წყაროები მნიშვნელოვნად აუმჯობესებენ სპორების ფორმირებას. მათ შორის, პეპტონმა ხელი შეუწყო ყველაზე დიდი რაოდენობით სპორების დაგროვებას 7.2 x 10^{11} სპორა/გ სუბსტრატზე და საკონტროლო საკვებ არესთან შედარებით სპორების რაოდენობა გაიზარდა 8-ჯერ. სწორედ ამიტომ, შეფასებულ იქნა პეპტონის კონცენტრაციის ზეგავლენა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს სპორების ფორმირებაზე, სიმინდის კაჭეჭის მყარფაზოვანი ფერმენტაციისას.

საკვებ არეში აზოტის კონცენტრაციის თანდათანობით 200 მილიმოლამდე გაზრდის პირობებში, პროდუცირებული სპორების რაოდენობა გაიზარდა 1 x 10^{11} სპორა/გ-დან 8.2 x 10^{11} სპორა/გ-მდე, ე.ი. სპორების გამოსავლიანობა გაიზარდა 8-ჯერ საკონტროლო საკვებ არესთან შედარებით (ფიგურა 7). აღსანიშნავია, რომ ფერმენტაციისას, საკვებ არეში აზოტის კონცენტრაციამ საფინალო pH-ზე უმნიშვნელო ზეგავლენა მოახდინა: ის შეიცვალა 6.7-დან საკონტროლო საკვებ არეში 7.1-მდე არეში პეპტონის მაქსიმალური კონცენტრაციით. ამდენად, ექსპერიმენტის შემდგომი მსვლელობისას *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს კულტივირებისთვის პეპტონი 40 გ/ლ-ზე კონცენტრაციით წარმოადგენდა აზოტის ძირითად წყაროს.



ფიგურა 7. აზოტის წყაროს კონცენტრაციის გავლენა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს სპორების დაგროვებაზე სიმინდის კაჭეჭის მყარფაზოვანი ფერმენტაციის დროს



ფიგურა 8. მარილების გავლენა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს სპორების დაგროვებაზე სიმინდის კაჭეჭის მყარფაზოვანი ფერმენტაციის დროს

4.2.3. შერჩეული მარილების გავლენა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს პრობიოტიკების წარმოებაზე მყარფაზოვანი ფერმენტაციის დროს

ექსპერიმენტების მიმდინარეობისას შეფასდა ოპტიმიზებულ საკვებ არეში ზოგიერთი მარილის დამატების ზეგავლენა. მე-8 ფიგურით გამოსახული შედეგების თანახმად, საკვებ არეში KH_2PO_4-ის კონცენტრაციის გაორმაგებამ იქონია დადებითი გავლენა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს სპორების პროდუცირებაზე, გაიზარდა რა მათი გამოსავლიანობა 8.1 x 10^{11} სპორა/გ-დან 9 x 10^{11} სპორა/გ-მდე. საკვებ არეში $MgSO_4$-ს გაორმაგებული კონცენტრაციით დამატებამ, ასევე ოდნავ გაზარდა სპორების რაოდენობა 9.4 x 10^{11} სპორა/ გ - მდე. საინტერესოა, რომ NaCl-ს 1 გ/ლ კონცენტრაციით დამატებამ საკვებ არეში გამოიწვია ყველაზე ძლიერი ეფექტი სპორების წარმოქმნაზე - სპორების გამოსავლიანობა გაიზარდა 20%-ით, საკონტროლო საკვებ არეში მიღწეულ გამოსავლიანობასთან შედარებით. ტესტირებული მარილების კონცენტრაციის შემდგომმა გაორმაგებამ აღარ იმოქმედა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს სპორაწარმოებაზე. აღნიშნულიდან გამომდინარე, ექსპერიმენტისთვის შეირჩა 60 მლ ოპტიმიზებული საკვები არით დატენიანებული 15 გ ზრდის სუბსტრატი, შემდეგი

შემადგენლობით (გ/ლ): პეპტონი – 40.0, KH_2PO_4 – 2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 1.0, NaCl – 1.0, საფუარის ექსტრაქტი – 2.0.

4.2.4. კულტივირების ტემპერატურის გავლენა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს პრობიოტიკების წარმოებაზე მყარფაზოვანი ფერმენტაციის დროს

ცდების ცალკეულ ექსპერიმენტებში შევისწავლეთ ბაქტერიების ზრდის ტემპერატურის გავლენა სპორების გამოსავლიანობაზე. *B. amyloliquefaciens* B-1895-ის თანაობით სიმინდის კაჭეჭის მყარფაზოვანი ფერმენტაცია ჩატარდა 32°C, 37°C და 42°C ტემპერატურაზე. მიღებულმა შედეგებმა გვიჩვენა, რომ ზრდის პროცესში საკვები არის pH-ის ცვლილებები არ იყო დამოკიდებული კულტივირების ტემპერატურაზე (ცხრილი 16). შაქრების რაოდენობა ფერმენტირებულ ბიომასაში იყო დაბალი ცდის სამივე ვარიანტში და ასევე არ იყო დიდად დამოკიდებული ზრდის ტემპერატურაზე. თუმცა შედარებით დაბალ ტემპერატურაზე გაზრდილმა ბაქტერიებმა გამოაჟღავნეს ყველაზე დაბალი ენდოგლუკანაზური და ქსილანაზური აქტივობები. უფრო მეტიც, აშკარად, *B. amyloliquefaciens* B-1895 არის თერმოფილური ბაქტერია, ზრდის ტემპერატურის ოპტიმუმით 37-42°C-ს ფარგლებში. შეიძლება ვივარაუდოთ, რომ ამ პირობებში გაზრდილი ბაცილების ჰიდროლაზური ფერმენტების შედარებით მაღალი აქტივობა უზრუნველყოფდა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს ნახშირბადის წყაროთი და განაპირობებდა უჯრედების მაქსიმალურ დაგროვებას. საბოლოოდ, ასეთმა ვითარებამ უზრუნველყო სპორების მაქსიმალური გამოსავლიანობა. მე-16 ცხრილიდან ჩანს, რომ 37 და 42°C-ზე დაგროვილი სპორების მაჩვენებელი 80 და 140%-ით აღემატება 32°C ტემპერატურაზე მიღებულ შედეგს.

ცხრილი 16. კულტივირების ტემპერატურის გავლენა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს ზრდის პროცესზე და სპორების დაგროვებაზე სიმინდის კაჭეჭის მყარფაზოვანი ფერმენტაციის დროს

ტემპერატურა	საკვები არის pH	შაქრები, მგ/გ ბიომასაზე	CMCაზა, ერთ/გ ბიომასაზე	ქსილანაზა, ერთ/გ ბიომასაზე	სპორა x 10^{12}/გ ბიომასაზე
32°C	6.5 ± 0.1	0.04 ± 0.01	0.21 ± 0.03	0.17 ± 0.03	0.5 ± 0.1
37 °C	6.6 ± 0.1	0.10 ± 0.01	0.91 ± 0.16	0.55 ± 0.10	0.9 ± 0.1
42 °C	6.6 ± 0.1	0.07 ± 0.01	0.90 ± 0.17	0.68 ± 0.08	1.2 ± 0.1

4.2.5. ყველის შრატისა და ხაჭოს შრატის ზეგავლენა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს პრობიოტიკების წარმოებაზე მყარფაზოვანი ფერმენტაციის დროს

საკვები არის ოპტიმიზაციის ბოლო ეტაპზე მოხდა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს სპორების პროდუცირებისთვის ყველის და ხაჭოს შრატის გამოყენება დისტილირებული წყლის ნაცვლად. წინა ექსპერიმენტების მსგავსად, ოპტიმიზებული საკვები არით დატენიანებულმა სიმინდის კაჭეჭმა მყარფაზოვანი ფერმენტაციისას განაპირობა ბაცილის სპორების მაღალი გამოსავლიანობა 0.98 x 10^{12}/გ ბიომასაზე (ცხრილი 17). მხოლოდ ხაჭოს შრატით დატენინებულმა სიმინდის კაჭეჭმა ხელი შეუწყო კარგ ბაქტერიულ ზრდას, მაგრამ საკონტროლო საკვებ არესთან შედარებით 22%-ით შეამცირა სპორების გამოსავლიანობა. ოპტიმიზებული საკვები არის კომპონენტების ხაჭოს შრატში დამატებამ ბაცილების სპორების პროდუცირება ოდნავ გააუმჯობესა, თუმცა სპორების გამოსავლიანობა უფრო დაბალი იყო, ვიდრე ოპტიმიზებულ საკონტროლო საკვებ არეში.

სხვა შედეგი იქნა მიღებული ყველის შრატის გამოყენების შემთხვევაში. სიმინდის კაჭეჭის ყველის შრატით დატენიანებამ ხელი შეუწყო სპორების ფორმირებას და სპორების რაოდენობა გაიზარდა 1.05 x 10^{12} სპორა/გ-მდე. გარდა ამისა, ყველის შრატში ოპტიმიზებული საკვები არის ყველა კომპონენტის დამატებამ მნიშვნელოვნად შეუწყო ხელი სპორულაციის პროცესს და საკონტროლო საკვებ არესთან შედარებით 26%-ით გაზარდა სპორების გამოსავლიანობა.

ცხრილი 17. ყველის შრატისა და ხაჭოს შრატის გავლენა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს სპორების დაგროვებაზე სიმინდის კაჭეჭის მყარფაზოვანი ფერმენტაციის დროს

საკვები არე	საბოლოო pH	რედუცირებული შაქრები (მგ/გ$^{-1}$)	CMCაზა (ერთ/გ$^{-1}$)	ქსილანაზა (ერთ/გ$^{-1}$)	სპორები (No. x 10^{12} g^{-1})
კონტროლი	6.9 ± 0.1	1.1 ± 0.2	0.9 ± 0.1	3.7 ± 0.5	0.98 ± 14
ხაჭოს შრატი	7.5 ± 0.2	4.1 ± 0.6	0.8 ± 0.1	2.0 ± 0.3	0.80 ± 13
ხაჭოს შრატი + საკვები არე	7.8 ± 0.2	2.5 ± 0.3	1.1 ± 0.2	2.2 ± 0.4	0.87 ± 10
ყველის შრატი	6.6 ± 0.2	4.6 ± 0.5	1.0 ± 0.1	2.4 ± 0.3	1.05 ± 12
ყველის შრატი + საკვები არე	6.4 ± 0.1	2.3 ± 0.3	1.1 ± 0.2	2.3 ± 0.3	1.23 ± 14

უნდა აღინიშნოს, რომ ხაჭოს შრატით დატენიანებული სიმინდის კაჭეჭის *B. amyloliquefaciens* B-1895-ით მყარფაზოვანი ფერმენტაციის დროს საკვები არის საბოლოო pH იზრდებოდა 6.9-დან 7.5-7.8-მდე (ცხრილი 17). შესაძლებელია ვივარაუდოთ, რომ ეს გარემოება უზრუნველყოფდა ბაქტერიების ზრდას, მაგრამ ამცირებდა სპოროგენეზის პროცესის ეფექტიანობას. მიღებული შედეგების შედარებითი ანალიზი აჩვენებს, რომ ყველის შრატით დატენიანებული სიმინდის კაჭეჭის *B. amyloliquefaciens* B-1895-ით მყარფაზოვანი ფერმენტაციისას, საკვები არის საბოლოო pH შემცირდა 6.9-დან 6.4 - 6.6-მდე და შესაძლებელია ითქვას, რომ ეს ასტიმულირებდა ბაქტერიული კულტურის სპორულაციას.

საინტერესოა, რომ ფერმენტირებულ ბიომასაში მარედუცირებელი შაქრების განსაზღვრამ გამოავლინა შაქრების 2-4-ჯერ მაღალი კონცენტრაცია, კონტროლთან შედარებით. თუმცა, შესაძლებელია ვივარაუდოთ, რომ შაქრების გაზრდილი კონცენტრაცია სპოროგენეზის პროცესზე არ მოქმედებდა უარყოფითად იმიტომ, რომ ყველის შრატის თანაობისას სპორულაციის ეფექტიანობა იყო ყველაზე მაღალი.

და ბოლოს, ფერმენტული აქტივობის შესწავლამ აჩვენა, რომ სიმინდის კაჭეჭის მყარფაზოვანი ფერმენტაციის დროს დისტილირებული წყლის შრატით შეცვლამ არ იქონია მნიშვნელოვანი გავლენა ცელულაზურ აქტივობაზე, მაგრამ მცირედით შეამცირა ქსილანაზური აქტივობა. მიუხედავად ამისა, ჰიდროლაზური ფერმენტების აქტივობა სავსებით უზრუნველყოფდა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს ნახშირბადის წყაროთი და განაპირობებდა ბაქტერიების ოპტიმალურ ზრდას.

ცხრილი 18. ყველის შრატისა და ხაჭოს შრატის გავლენა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს სპორების დაგროვებაზე სპირტის წარმოების ნარჩენების მყარფაზოვანი ფერმენტაციის დროს

საკვები არე	საბოლოო pH	მარედუცირებელი შაქრები მგ g^{-1}	CMCაზა ერთეული g^{-1}	ქსილანაზა ერთეული g^{-1}	სპორები No. x 10^{12} g^{-1}
კონტროლი	8.1 ± 0.1	1.2 ± 0.2	1.0 ± 0.1	3.0 ± 0.4	0.75 ± 10
ხაჭოს შრატი	8.2 ± 0.1	8.4 ± 1.5	3.2 ± 0.4	5.7 ± 0.5	0.80 ± 12
ხაჭოს შრატი + საკვები არე	8.0 ± 0.1	7.8 ± 1.4	3.6 ± 0.5	5.6 ± 0.7	0.86 ± 9
ყველის შრატი	8.3 ± 0.1	7.6 ± 1.0	2.7 ± 0.4	5.3 ± 0.5	1.03 ± 11
ყველის შრატი + საკვები არე	8.1 ± 0.1	7.0 ± 1.2	3.3 ± 0.6	3.8 ± 0.5	0.97 ± 11

აგრეთვე, ტესტირებულ იქნა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს სპორაწარმოება სპირტის წარმოების ნარჩენების მყარფაზოვან ფერმენტაციისას. მე-18 ცხრილის მიხედვით, ოპტიმიზებული სინთეზური საკვები არით დატენიანებული ზრდის სუბსტრატი უზრუნველყოფდა ბაცილების კარგ ზრდას, სპორების გამოსავლიანობით 0.75 x 10^{12} სპორა/გ. ამ ლიგნოცელულოზური სუბსტრატის ხაჭოს შრატით დატენიანებამ ოდნავ გაზარდა ბაქტერიების სპორების გამოსავლიანობა. თუმცა, ხაჭოს შრატში საკვები არის კომპონენტების დამატებამ გაზარდა სპორების რაოდენობა 0.86 x 10^{12} სპორა/გ-მდე. როგორც სიმინდის კაჭეჭის მყარფაზოვანი ფერმენტაციის შემთხვევაში, ყველის შრატი ასევე აღმოჩნდა ხელსაყრელი *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს სპორების ფორმირებისთვის, განაპირობა რა კონტროლთან

შედარებით სპორების გამოსავლიანობის 37%-ით გაზრდა. თუმცა, სიმინდის კაჭეჭისგან განსხვავებით, ყველის შრატით დატენიანებულმა ეთანოლის წარმოების ნარჩენებმა, რომელსაც დაემატა საკვები არის კომპონენტები, ოდნავ შეამცირა ბაქტერიული სპორების რაოდენობა.

მე-18 ცხრილში მოყვანილი შედეგების ანალიზი ცხადყოფს, რომ სპირტის წარმოების ნარჩენების მყარფაზოვანი ფერმენტაცია *B. amyloliquefaciens* B-1895-ით მიმდინარეობდა საკვები არის pH-ის ზრდით 8.0-8.3-მდე, არის შემადგენლობისგან დამოუკედებლად. უფრო მეტიც, სპირტის წარმოების ნარჩენების ფერმენტაცია ხაჭოს ან ყველის შრატის თანაობისას კონტროლთან შედარებით, მიმდინარეობდა მარედუცირებელი შაქრების შემცველობის მნიშვნელოვანი ზრდით. თუმცა, ეთანოლის წარმოების ნარჩენების ზრდის სუბსტრატად გამოყენების შემთხვევაში დაახლოებით 3-ჯერ გაიზარდა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს CMCაზური აქტივობა და გაძლიერდა ქსილანაზური აქტივობა.

4.2.6. პრობიოტიკების წარმოების მასშტაბირება მცენარეული ნედლეულის მყარფაზოვანი ფერმენტაციის დროს

პრობიოტიკული პრეპარატების წარმოების მასშტაბირება ჩატარდა თერმოსტატსა და კლიმატოკამერაში (სურათი 1, 2). თერმოსტატში კულტივირებისას, ბიომასისთვის ჰაერის მისაწოდებლად გამოყენებული იქნა სპეციალური მემბრანიანი პოლიპროპილენის პარკები.

სურათი 1. *B. subtilis* KATMIRA 1933-სა და *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს პრობიოტიკული პრეპარატების წარმოების მასშტაბირება თერმოსტატში

სურათი 2. *B. subtilis* KATMIRA 1933-სა და *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს პრობიოტიკული პრეპარატების წარმოების მასშტაბირება კლიმატოკამერაში

კლიმატოკამერაში პრობიოტიკული ბაქტერიების კულტივირება მოხდა ზრდის შესაბამისი სუბსტრატებით შევსებულ ალუმინის კიუვეტებში, სიმინდის კაჭეჭით - *B. amyloliquefaciens* B-1895-სთვის და ხორბლის სპირტის წარმოების ნარჩენებით - *B. subtilis* Katmira 1933-სთვის. ორივე შემთხვევაში, 1 კგ ზრდის სუბსტრატი დატენიანებული იყო 1.6 ლ ოპტიმიზებული, თითოეულ შტამისთვის განკუთვნილი საკვები არით. *B. subtilis* Katmira 1933-ისა და *B. amyloliquefaciens* B-1895-ის ოთხდღიანი კულტივირების შემდეგ სპორების გამოსავლიანობამ შეადგინა 1.4 x 10^{12} სპორა/გ ბიომასაზე და 8.4 x 10^{11} სპორა/გ ბიომასაზე, შესაბამისად.

ცხრილი 19. ბაზიდიალური სოკოების *Lentinus edodes* 2175 და *L. edodes* 2191 მიერ ფერმენტირებულ სუბსტრატებზე *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს პრობიოტიკული შტამის სპორების დაგროვება.

ვარიანტები	სპორების რაოდენობა/1 გ სუბსტრატზე	
	B. amyloliquefaciens B-1895	*B. subtilis* Katmira 1933
Lentinus edodes 2175 სიმინდის კაჭეჭზე	8.6×10^{11}	9.3×10^{11}
Lentinus edodes 2175 ხორბლის ნამჯაზე	5.6×10^{11}	2.1×10^{11}
Lentinus edodes 2191 ხორბლის ნამჯაზე	2.7×10^{10}	3.4×10^{11}

ასევე, პირველად იქნა ტესტირებული საკვები სოკოების *L. edodes* 2175 და *L. edodes* 2191-ის მიერ ფერმენტირებული სუბსტრატები, როგორც პრობიოტიკული ბაქტერიების ზრდის სუბსტრატი. სოკოები წინასწარ იქნა გაზრდილი პოლიპროპილენის მემბრანიან პარკებში, ხორბლის ნამჯაზე და სიმინდის კაჭეჭზე. ნაყოფსხეულების მოსავლის აღების შემდეგ, ფერმენტირებულ სუბსტრატებზე სტერილიზაციის გარეშე, გაზრდილი იქნა პრობიოტიკული შტამები *B. subtilis* Katmira 1933 და *B. amyloliquefaciens* B-1895. სუბსტრატის ტენიანობა შეადგენდა დაახლოებით 60%-ს და მყარფაზოვანი ფერმენტაცია მიმდინარეობდა კიუვეტებზე, კლიმატოკამერაში, 72 სთ-ის განმავლობაში 37^0C ტემპერატურაზე. მე-19 ცხრილში მოყვანილი შედეგები ცხადყოფენ, რომ შიიტაკით ფერმენტირებული ბიომასები წარმოადგენენ ზრდის შესაფერის სუბსტრატს პრობიოტიკული ბაქტერიების კულტივირებისთვის. უდაოდ, ხორბლის ნამჯასთან შედარებით, სიმინდის კაჭეჭის ბიომასა არის უფრო სასურველი პრობიოტიკული ბაქტერიების წარმოებისათვის. კერძოდ, სიმინდის კაჭეჭზე და ხორბლის ნამჯაზე (*L. edodes* 2175 კულტივირების შემდეგ) სპორების რაოდენობა *B. amyloliquefaciens* B-1895 მყარფაზოვანი ფერმენტაციისას შეადგენდა 8.6×10^{11} და 5.6×10^{11} სპორა/გ. უფრო მეტიც, სიმინდის კაჭეჭზე ზრდის შედეგად *B. subtilis* Katmira 1933-ს სპორების გამოსავლიანობა 4-ჯერ

აღემატებოდა ხორბლის ნამჯის ფერმენტაციის დროს მიღებულ სპორების რაოდენობას. უნდა აღინიშნოს, რომ სპორების გამოსავლიანობა, სავარაუდოდ, დამოკიდებულია სოკოს შტამზე. ნათელია, რომ *L. edodes* 2175-ს მიერ ფერმენტირებული ხორბლის ნამჯა უზრუნველყოფდა ორივე პრობიოტიკული ბაქტერიის სპორების მრავალჯერად ზრდას.

4.3. *Bacillus subtilis* KATMIRA 1933 და *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 - ს ანტიბაქტერიული აქტივობის *in vitro* ტესტირება და *Bacillus subtilis* KATMIRA 1933-ს სამკურნალო-პროფილაქტიკური ეფექტის ტესტირება ამერიკული სიდამპლით დაავადებულ ცოცხალ ფუტკრებზე

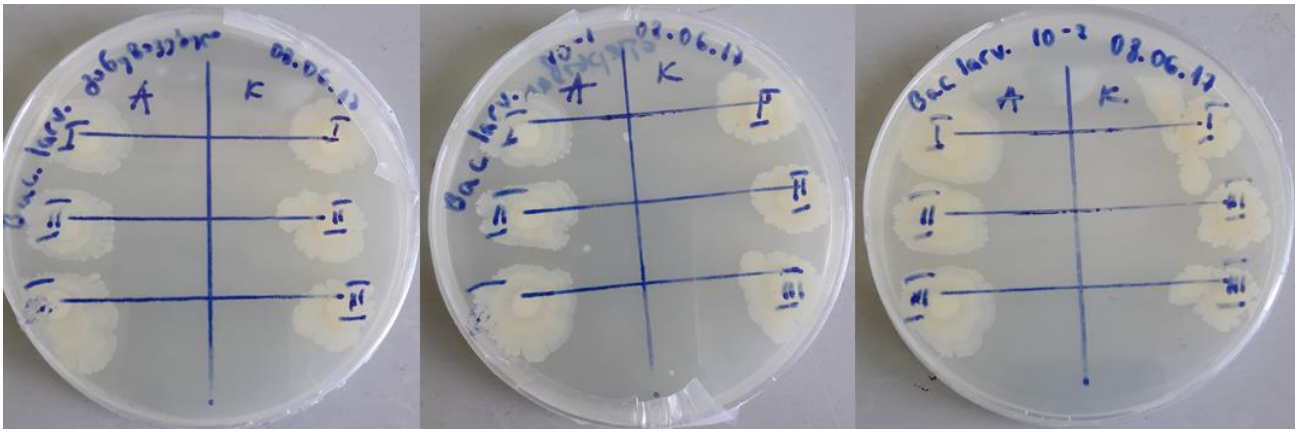
შესწავლილი იქნა *B. subtilis* KATMIRA 1933 და *B. amyloliquefaciens* B-1895 - ის ანტიბაქტერიული აქტივობა *in vitro* პირობებში, ფუტკრის ამერიკული სიდამპლის გამომწვევ ბაქტერიაზე -*P. larvae*. კვლევისათვის გამოყენებული იქნა *B. subtilis* KATMIRA 1933 და *B. amyloliquefaciens* B-1895 სიღრმული ფერმენტაციით მიღებული სპორები.

სურათი 3. *B. subtilis* KATMIRA 1933-სა და *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს სპორების განუზავებელი, 10^{-1}, 10^{-2} კონცენტრაციებით გამოწვეული ანტიბაქტერიული აქტივობა *P. larvae*-ს მიმართ *in vitro* პირობებში (ინჰიბირება გამოსახულია გაუფერულებული ზონებით)

პეტრის თასებზე *P. larvae* - ს 48 საათიანი ინკუბირების შემდეგ, მყარი საკვები არის ზედაპირზე განლაგებული ბაცილებით დასველებული დისკების ირგვლივ მკაფიოდ გამოისახა ინჰიბირების ზონები, რაც მიუთითებს, რომ *B. subtilis* KATMIRA

1933-მა და *B. amyloliquefaciens* B-1895-მა შეაჩერა *P.larvae*-ს უჯრედების ზრდა-განვითარება (სურათი 3).

აქვე, აღსანიშნავია, რომ 96 საათიანი დაყოვნების შემდეგ, ინჰიბირების ზონებში პრობიოტიკების ნაზრდის დიამეტრი თითქმის ყველა შემთხვევაში აჭარბებდა 15 მმ-ს (სურათი 4).

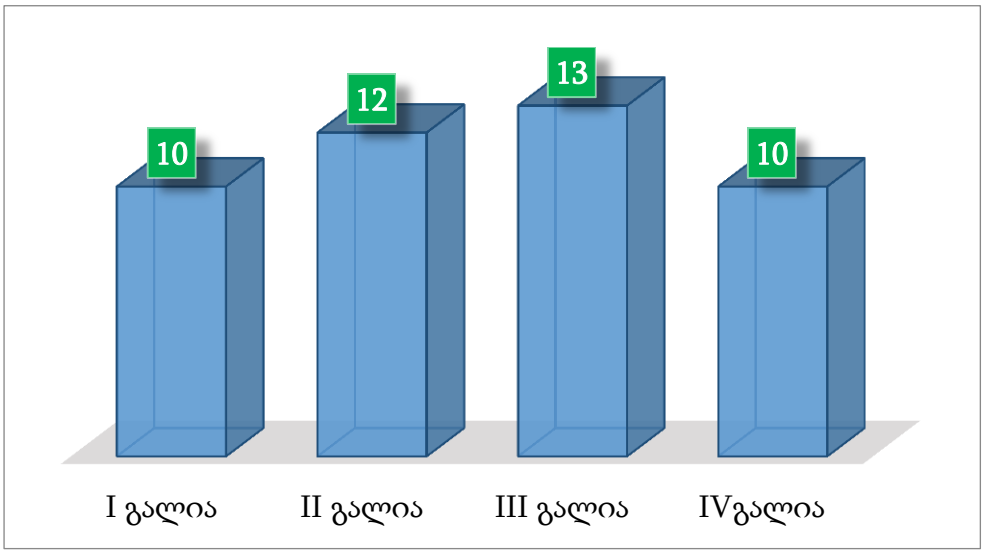


სურათი 4. *B. subtilis* KATMIRA 1933-სა და *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს ნაზრდი ინჰიბირების ზონებში

B. subtilis KATMIRA 1933-ს სამკურნალო-პროფილაქტიკური აქტივობის შესწავლა განხორციელდა ორ ეტაპად - ლაბორატორიულ პირობებსა და საფუტკრე მეურნეობაში.

ლაბორატორიულ პირობებში ცოცხალ ფუტკრებზე *B. subtilis* KATMIRA 1933-ს აქტივობის ტესტირებისთვის მომზადდა 4 გასტერილებული, სპეციალური გალია. ექსპერიმენტი მიმდინარეობდა 45 დღე. თითოეულ გალიაში მოთავსდა 40 ცოცხლი, ჯანმრთელი ფუტკარი. ფუტკარს საკვები მიეწოდებოდა შაქრის წყალხსნარის 100 %-იანი კონცენტრაციით, დისტილირებულ წყალზე. ყველა გალიას საკვები ეცვლებოდა ყოველ 48 საათში. I გალიისთვის განკუთვნილ საკვებ ხსნარს ემატებოდა *B. subtilis* KATMIRA 1933 სპორები 10^6/მლ კონცენტრაციით ყოველ 48 საათში საკვები პორციის შეცვლისას, II გალიისთვის განკუთვნილ საკვებ ხსნარს ემატებოდა ზემოაღნიშნული პრინციპით *B. subtilis* KATMIRA 1933 სპორები 10^8/მლ კონცენტრაციით. III და IV გალიას (კონტროლი) მიეწოდებოდა მხოლოდ საკვები. ოთხივე გალია მოთავსებული

იყო თერმოსტატში, ტენიანობისა და ვენტილაციის ოპტიმალურ პირობებში, 29^{0}C ტემპერატურაზე (ფიგურა 9).

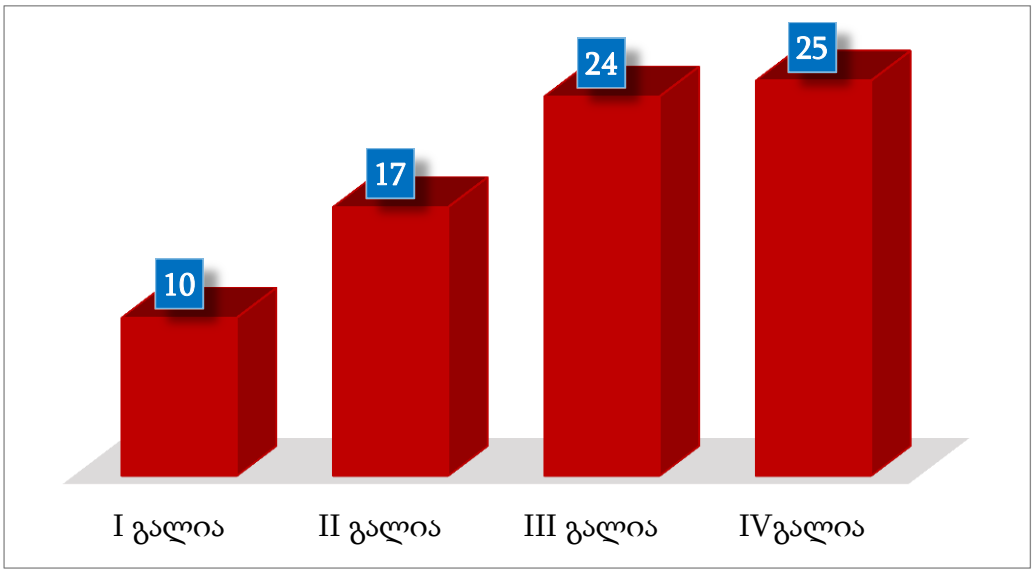


ფიგურა 9. მკვდარი ფუტკრების რაოდენობა დაინფიცირებამდე

ექსპერიმენტის მე-10 დღეს I, II და III საკონტროლო გალია დაინფიცირდა ფუტკრის ამერიკული სიდამპლით - *P. larvae*. დაავადების გამომწვევი ეტალონური შტამი მოწოდებული იყო საქართველოს სოფლის მეურნეობის სამინისტროს ლაბორატორიის მიერ. IV საკონტროლო გალია არ დაინფიცირებულა. ექსპერიმენტის მე-19 დღეს მოხდა I, II და III გალიის ფუტკრების ტესტირება დაინფიცირებაზე საქართველოს სოფლის მეურნეობის სამინისტროს ლაბორატორიის ფუტკრის ამერიკული სიდამპლის დიაგნოსტიკის სტანდარტული ოპერაციული პროცედურის შესაბამისად. დაინფიცირების ტესტის შედეგი იყო დადებითი (სურათი 5).

სურათი 5. ფუტკრების ამერიკული სიდამპლით დაინფიცირების ტესტირება

ექსპერიმენტის მიმდინარეობისას, დინამიკაში, სხვადასხვა გალიაში ფუტკრების ქცევა და სიკვდილიანობა იყო განსხვავებული, კერძოდ, ექსპერიმენტის ბოლოს I და II გალიაში მკვდარი ფუტკრების რაოდენობა იყო უფრო მცირე (20 და 29 ფუტკარი, შესაბამისად), ვიდრე საკონტროლო III გალიაში (37 ფუტკარი), ხოლო IV საკონტროლო გალიაში დაიხოცა 35 ფუტკარი (ფიგურა 10). მიღებული შედეგებიდან გამომდინარე, საინტერესოა აღინიშნოს, რომ საკვები ხსნარი *B. subtilis* KATMIRA 1933 სპორების 10^6/მლ კონცენტრაციით აღმოჩნდა უფრო ეფექტიანი, ვიდრე საკვები ხსნარი სპორების 10^8/მლ კონცენტრაციით. აღნიშნულიდან გამომდინარე, მიზანშეწონილია მომავალი კვლევებით დადგინდეს ბაცილის სპორების ოპტიმალური კონცენტრაცია.



ფიგურა 10. მკვდარი ფუტკრების რაოდენობა დაინფიცირების შემდეგ, ექსპერიმენტის ბოლოს

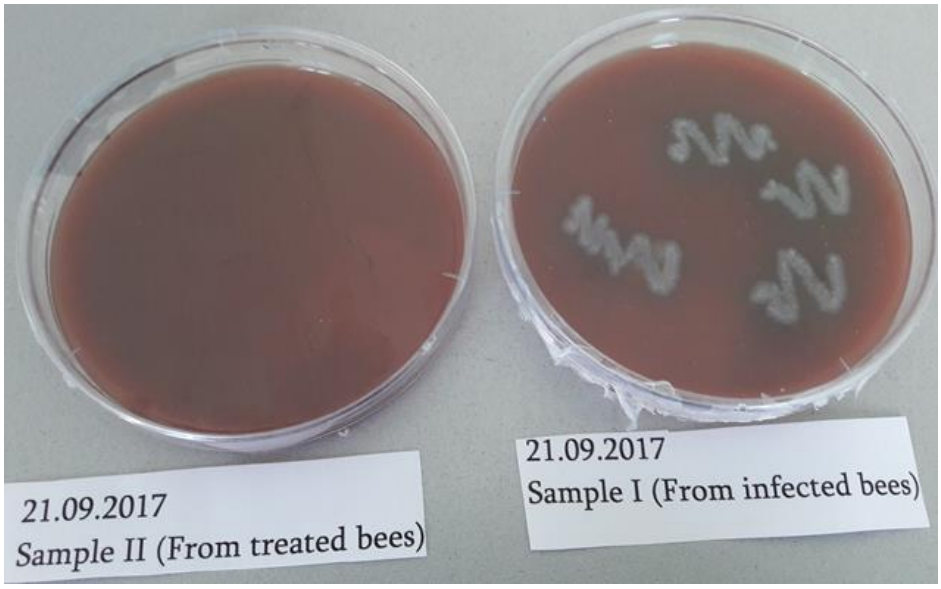
საფუტკრე მეურნეობა შერჩეული იქნა ქ. ზუგდიდში (მფლობელი მარინა ქარდავა, ფ/პ, 50 სკა, ტელ: 555 64 31 73). 2017 წლის მაისის დასაწყისში, აღნიშნულ მეურნეობაში, სამ სკაში დაფიქსირდა ამერიკული სიდამპლით დაინფიცირების შემთხვევა, რის შემდგომაც ფუტკრის დაავადებული ოჯახები გადატანილ იქნა ახალ, დეზინფიცირებულ სკებში. სამკურნალო-პროფილაქტიკური ღონისძიებების განსახორციელებლად მომზადდა *B. subtilis* KATMIRA 1933 - ის სპორების სუსპენზია (დისტილირებულ წყალში) 1.8 x 10^{11} კონცენტრაციით და პრეპარატის ტრანსპორტირება თბილისიდან ზუგდიდში მოხდა სათანადო ტემპერატურული რეჟიმის დაცვით (+6^0C). შერჩეულ სამ სკაში, სამედიცინო დანიშნულების

სტერილური შპრიცის საშუალებით, ჩარჩოებს შორის მოხდა პრეპარატის შესხურება 10 მლ-ის ოდენობით. აღნიშნული სამკურნალო-პროფილაქტიკური ღონისძიება ჩატარდა სამჯერ, სამდღიანი ინტერვალით (სურათი 6). ბოლო შესხურებიდან შვიდდღიანი დაყოვნების შემდგომ, ექსპერიმენტისთვის შერჩეულ სკებში ამერიკული სიდამპლის კლინიკური ნიშნები აღარ აღინიშნებოდა

სურათი 6. *B. subtilis* KATMIRA 1933-ს პრობიოტიკული პრეპარატით ფუტკრის ამერიკული სიდამპლით დაავადებული ფუტკრების დამუშავება

მიღებული შედეგის გადამოწმება მოხდა ლაბორატორიულად, კერძოდ: ექსპერიმენტისთვის შერჩეული სკების ფუტკრებიდან და ლარვებიდან მომზადდა მასალა ტესტირებისთვის. საქართველოს სოფლის მეურნეობის სამინისტროს ლაბორატორიის ფუტკრის ამერიკული სიდამპლის დიაგნოსტიკის სტანდარტული

ოპერაციული პროცედურის შესაბამისად გადაითესა კოლუმბია-სისხლიან აგარზე. პეტრის თასები მოთავსდა თერმოსტატში 37^0 C-ზე. 48 სათიანი ინკუბაციის შემდგომ ფუტკრის ამერიკული სიდამპლის გამომწვევის - *P. larvae*-ს კოლონიების ნაზარდი არ დაფიქსირდა (სურათი 7). აღნიშნულიდან გამომდინარე, შესაძლებელია დავასკვნათ, რომ პრობიოტიკით (*B. subtilis* KATMIRA 1933) ფუტკრის ამერიკული სიდამპლით დაავადებული სკების დამუშავების შემდგომ, როგორც კლინიკურად, ასევე ლაბორატორიულად ფუტკრებსა და ლარვებში დაავადების კვალი არ აღინიშნებოდა.



სურათი 7. *B. subtilis* KATMIRA 1933-ს პრობიოტიკული პრეპარატით ფუტკრის ამერიკული სიდამპლის მიმართ განხორციელებული სამკურნალო-პროფილაქტიკური ღონისძიების ეფექტიანობის ლაბორატორიული ტესტირება (ნიმუში ინახებოდა სათანადო პირობებში და ორივე ექსპერიმენტი ჩატარდა ერთდროულად)

5. მიღებული შედეგების განხილვა

პრობიოტიკული სპორაწარმომქმნელი ბაქტერიების წარმოების კონკურენტუნარიანი ტექნოლოგიის შემუშავებისთვის, პირველ რიგში, საჭიროა *Bacillus* spp-ს ზრდისა და სპორულაციის მარეგულირებელი ფიზიოლოგიური მექანიზმის შესწავლა და ორივე პროცესისათვის კვების ოპტიმალური პირობების დადგენა. *Bacillus* spp-ს სპორულაცია მნიშვნელოვნადაა დამოკიდებული კულტივირების პირობებზე და ბაქტერიის ფიზიოლოგიურ თავისიბურებზე (Monteiro et al., 2005; Sen, Babu, 2005; Rao et al., 2007; Chen et al., 2010; Posada-Uribe et al., 2015).

წარმოდგენილი კვლევის შედეგები იძლევა ახალ ცოდნას *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს და *B. subtilis* KATMIRA 1933-ს ფიზიოლოგიის შესახებ და ადასტურებს ფუნდამენტური კვლევის საფუძველზე პრობიოტიკების მაღალი გამოსავლიანობის მიღწევის შესაძლებლობას. კვლევის განხორციელებისას, შევეცადეთ შეგვემცირებინა პრობიოტიკების წარმოების ღირებულება. პრობიოტიკების წარმოების ღირებულება შეიძლება შემცირდეს ორი მიდგომით - სპორების გამოსავლიანობის მნიშვნელოვანი გაზრდით და საკვები არის კომპონენტად იაფი ნედლეულის გამოყენებით. ამ მიზნის მისაღწევად ჩვენს მიერ პირველად იქნა ტესტირებული საქართველოში ადვილად ხელმისაწვდომი მცენარეული ნედლეულის ფართო სპექტრი, როგორც ბაქტერიების ზრდის სუბსტრატი. როგორც ავღნიშნეთ ლიტერატურის მიმოხილვაში, ბაცილების სპორების წარმოქმნაზე ლიგნოცელულოზური ზრდის სუბსტრატის გავლენის შესახებ ინფორმაცია მწირია. მაგალითად, ზრდის ოთხი სუბსტრატიდან, კასავას ფესვებმა უზრუნველყო *Bacillus* spp. KKU02 და KKU03 საუკეთესო სპორაწარმოება სიღრმული ფერმენტაციისას (Wangka-Orm et al., 2014). აღნიშნული შტამები დაგროვდნენ, 8.32 x 10^8 და 1.35 x 10^8 სპორა/მლ რაოდენობით, შესაბამისად, საკვები არეში კასავას 100 გ/ლ ოპტიმალური კონცენტრაციის პირობებში. *B. amyloliquefaciens* B128 სიღრმული კულტივირების პირობებში ტაპიოკას (16.7 გ/ლ) და ლაქტოზას (12.7 გ/ლ) კომბინირებით სპორების გამოსავლიანობამ მიაღწია 5.92 x 10^8 სპორა/მლ (Rao et al., 2007). ჩვენს მიერ შერჩეული ბაქტერიებს აღმოაჩნდათ სპორების დაგროვების მძლავრად გამოხატული უნარი საკვებ არეებში ზოგიერთი მცენარეული ნედლეულის თანაობისას. კერძოდ, სიღრმული ფერმენტაციისას, სიმინდის კაჭეჭი,

ხორბლის სპირტის წარმოების ნარჩენი, მზესუმზირის კოპტონი, ხორბლის ქატო და მანდარინის ქერქი აღმოჩნდა ზრდის საუკეთესო სუბსტრატები *B. amyloliquefaciens* B-1895-ის სპორების მაღალი გამოსავლიანობით (8.2x 10^9 - 1.09 x 10^{10} სპორა/მლ) დაგროვებისთვის.

B. subtilis KATMIRA 1933 სიღრმული კულტივირებისას მზესუმზირის კოპტონმა ხელი შეუწყო ბაცილების ზრდას და ვეგეტატიური უჯრედების დაგროვებას, მაგრამ დათრგუნა მასობრივი სპორულაცია. ამ შტამისთვის მანდარინის ქერქმა 40 გ/ლ კონცენტრაციით უზრუნველყო სპორების ყველაზე მაღალი გამოსავლიანობა (5.7 x 10^{10} სპორა/მლ). სპორების გამოსავლიანობის ასეთი მკვეთრი ზრდა შესაძლებელია დაკავშირებული იყოს მანდარინის ქერქის ქიმიურ შემადგენლობასთან. ცელულოზის (21%), ჰემიცელულოზის (13%), პექტინის (13%) გარდა, მანდარინის ქერქი დიდი რაოდენობით შეიცავს წყალში ხსნად შაქრებს (32%) და ორგანულ მჟავებს, რომლებიც ხელს უწყობენ მიკროორგანიზმების ზრდას. შესაძლებელია ვივარაუდოთ, რომ ეს სუბსტრატი შეიცავს ზრდისა და ეფექტიანი სპორულაციისთვის ყველა საჭირო კომპონენტს. გარდა ამისა, ბაქტერიული კულტურის გლიკოზილჰიდროლაზური აქტივობა განაპირობებს მანდარინის ქერქის პოლისაქარიდების ნელ ჰიდროლიზს მეტაბოლიზირებად შაქრებამდე. შედეგად, მარედუცირებელი შაქრების კონცენტრაცია სიღრმული ფერმენტაციისას აღმოჩნდა დაბალი, რამაც ხელი შუწყო სპოროგენეზის პროცესს. ეს ჰიპოთეზა დადასტურდა იმ ფაქტით, რომ მანდარინის ქერქის კონცენტრაციის გაზრდისას 60 გ/ლ-მდე მარედუცირებელი შაქრების კონცენტრაცია სიღრმული ფერმენტაციის დასრულებისას აღმოჩნდა საკმაოდ მაღალი (1.1 მგ/მლ) და სპორების გამოსავლიანობა შემცირდა ორჯერ და მეტად.

ამ ჰიპოთეზის კიდევ ერთი დადასტურებაა სინთეზურ საკვებ არეში ბაქტერიების კულტივირებისას მიღებული შედეგები. *B. subtilis* KATMIRA 1933-ს კულტივირების დროს ნაჩვენები იქნა, რომ ნახშირბადის წყაროებს შორის გლუკოზა წარმოადგენს ნახშირბადის შესაფერის წყაროს სპორების ფორმირებისთვის და საკონტროლო არესთან შედარებით სპორების გამოსავლიანობა იზრდება 3-ჯერ და მეტად. აღსანიშნავია, რომ გლუკოზის კონცენტრაცია თამაშობს მნიშვნელოვან როლს ბაცილების სპოროგენეზში. კერძოდ, გლუკოზის უმცირესი კონცენტრაციის

პირობებში (2.0 გ/ლ) მიღწეულ იქნა სპორების მაქსიმალური გამოსავლიანობა (2.3 x 10^9 სპორა/მლ) და საკვებ არეში ნახშირბადის წყაროს კონცენტრაციის ზრდამ გამოიწვია სპორულაციის ეფექტიანობის შემცირება. მსგავსი შედეგი იქნა მიღებული *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს კულტივირებისას, როცა საკვებ არეში გლუკოზის შემცველობა იყო 4 გ/ლ და სპორების გამოსავლიანობამ მიაღწია მაქსიმუმს - 7.1 x 10^9 სპორა/მლ-ს. მიღებული შედეგები ემთხვევა მონტეიროსა და სხვების მონაცემებს, რომელთა მიხედვით (Monteiro et al., 2005) გლუკოზის კონცენტრაციის 5 გ/ლ-მდე გაზრდამ გამოიწვია ვეგეტატური უჯრედებისა და სპორების კონცენტრაციის ზრდა *B. subtilis* MB24-ის კულტივირებისას, მაშინ როდესაც გლუკოზამ საწყისი კონცენტრაციით 5 გ/ლ და მეტი დათრგუნა სპორულაციის პროცესი. სხვა ექსპერიმენტშიც (Posada-Uribe et al., 2015), გლუკოზა 11 გ/ლ კონცენტრაციით იყო ერთადერთი ფაქტორი, რომელმაც იქონია მნიშვნელოვანი უარყოფითი გავლენა *B. subtilis* EA-CB 0575-ის სპორების წარმოებაზე. აქედან გამომდინარე ნათელია, რომ სპორულაციის ეფექტიანობისა და სპორების გამოსავლიანობის ზრდისთვის საჭიროა საკვებ არეში გლუკოზის შედარებით დაბალი კონცენტრაცია - ნახშირბადის წყაროს ათვისება კულტივირების დასასრულს ძირითადი სტიმულიაა ბაცილების სპორულაციისთვის.

როგორც ცნობილია, მცენარეული ნედლეული, ჩვეულებისამებრ, არ შეიცავს აზოტს მიკროორგანიზმების ზრდისთვის საჭირო კონცენტრაციით და საჭიროა აზოტის დამატებითი რესურსი მათი ოპტიმალური ზრდისთვის. ამასთან დაკავშირებით, *Bacillus*-ის ზრდისა და სპორულაციისთვის ადექვატური პირობების უზრუნველსაყოფად, ფერმენტაციის დროს მანდარინის ქერქის შემცველ საკვებ არეს დაემატა აზოტის სხვადასხვა ორგანული და არაორგანული წყარო. ცდების შედეგები აჩვენებენ, რომ ბაცილების კულტივირების დროს სპორების გამოსავლიანობა ვარირებდა დიდი დიაპაზონით, აზოტის წყაროზე დამოკიდებულებით. საკვებ არეში პეპტონის დამატება აღმოჩნდა საუკეთესო პირობა *B. subtilis* KATMIRA 1933-ის სპორების პროდუცირებისთვის. პეპტონიანი საკვები არის პოზიტიური ზეგავლენა გამოიხატა ბიომასის მაღალ პროდუქტიულობასა და სპორულაციის მაღალ ეფექტიანობაში, რამაც ასევე განაპირობა საკვები არის შედარებით მაღალი pH. საპირისპიროდ, *B. subtilis* KATMIRA 1933-ის კულტივირებამ $(NH_4)_2SO_4$-ის თანაობისას

გამოიწვია საკვები არის pH-სა და სპორების გამოსავლიანობის მნიშვნელოვანი შემცირება. აგრეთვე გამოვლინდა, რომ $(NH_4)_2SO_4$ არის აზოტის შედარებით ცუდი წყარო *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს სპორების პროდუცირებისთვის, ვიდრე კაზეინის ჰიდროლიზატი ან KNO_3, რამაც მკვეთრად გააუმჯობესა სპორულაცია. საინტერესოა, რომ *B. subtilis*-ის სხვა შტამებზე ექსპერიმენტებში $(NH_4)_2SO_4$-ის (4.54%) კომბინირებამ სიმინდის ფქვილთან (1.2%) განაპირობა სპორების მაქსიმალური გამოსავლიანობა (Shi and Zhu, 2007). უფრო მეტიც, რაოს და სხვების მიერ (Rao et al., 2007) *B. amyloliquefaciens* B128-თვის საკვები არის შემადგენლობის ოპტიმიზაციისას ნაჩვენები იქნა, რომ $(NH_4)_2SO_4$ (1.8 გ/ლ) და პეპტონის (8.0 გ/ლ) ნარევმა უზრუნველყო სპორების ყველაზე მაღალ გამოსავლიანობა.

აგრეთვე, გამოვლინდა აზოტის დამატებითი წყაროს კონცენტრაციის როლი ბაცილების სპოროგენეზის პროცესში. ორივე ბაქტერიის კულტივირების დროს, საკვებ არეში აზოტის კონცენტრაციის თანდათანობით მომატებამ 0-დან 40 მილიმოლამდე გაზარდა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს სპორაწარმოქმნა 5.2×10^9-დან 2.8×10^{10} სპორა/მლ-მდე და *B. subtilis* KATMIRA 1933-ს კულტივირების დროს 2.0×10^{10}-დან 8.3×10^{10} სპორა/მლ-მდე. შემდგომ, აზოტის წყაროს კონცენტრაციის მომატებამ 80 მილიმოლამდე აშკარად შეაჩერა ბაქტერიული კულტურის ზრდა-განვითარება და სპორულაციის პროცესი. შესაძლებელია, ბაქტერიული კულტურების ასეთი რეაქცია განაპირობებული იყოს საკვები არის შედარებით მაღალი pH-ით და ჰიდროლაზური ფერმენტების საკმაოდ დაბალი აქტივობით და აქედან გამომდინარე, ნახშირბადის წყაროს ლიმიტირებით.

ამ კვლევის ფარგლებში, ჩვენს მიერ პირველად იქნა ნაჩვენები დისტილირებული წყლის ნაცვლად ყველისა და ხაჭოს შრატის გამოყენების შესაძლებლობა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს სპორაწარმოებისთვის. თუმცა, უნდა აღინიშნოს მიღებული შედეგების რამდენიმე საერთო თავისებურება ზრდის სუბსტრატთან დამოკიდებულების მხრივ. სიმინდის კაჭეჭის მყარფაზოვანი ფერმენტაციისთვის ხაჭოს შრატით დატენიანებამ ხელი შეუწყო კარგ ბაქტერიულ ზრდას, მაგრამ საკონტროლო (9.8×10^{11} სპორა/გ) ოპტიმიზებულ საკვებ არესთან შედარებით 22%-ით შეამცირა სპორების გამოსავლიანობა. პირიქით, ყველის შრატით დატენიანებულმა ლიგნოცელულოზურმა სუბსტრატმა ხელი შეუწყო სპორების

ფორმირებას და სპორების რაოდენობა გაიზარდა 1.05 x 10^{12} სპორა/გ-მდე. გარდა ამისა, ყველის შრატში ოპტიმიზებული საკვები არის ყველა კომპონენტის დამატებამ მნიშვნელოვნად შეუწყო ხელი სპორულაციის პროცესს და საკონტროლო საკვებ არესთან შედარებით 26%-ით გაზარდა სპორების გამოსავლიანობა.

გარკვეულწილად, განსხვავებული სურათი იქნა მიღებული სპირტის წარმოების ნარჩენების *B. amyloliquefaciens* B-1895-ით მყარფაზოვანი ფერმენტაციის დროს. ამ სუბსტრატის მხოლოდ ხაჭოს ან ყველის შრატით (ოპტიმიზირებული არის კომპონენტების გარეშე) დატენიანებამ გაზარდა ბაცილების სპორების გამოსავლიანობა, შესაბამისად 7 და 37 %-ით, კონტროლთან შედარებით. უფრო მეტიც, ეთანოლის საწარმოო ნარჩენის ზრდის სუბსტრატად გამოყენების შემთხვევაში, ხაჭოს და ყველის შრატით დატენიანებამ დაახლოებით 3-ჯერ და 2-ჯერ გაზარდა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს, შესაბამისად, CMCაზური და ქსილანაზური აქტივობა.

ცნობილია, რომ პრობიოტიკული პრეპარატების წარმოების ღირებულება დამოკიდებულია ფერმენტაციის მეთოდზე. დღეისათვის ინდუსტრიაში სიღრმული კულტივირება ყველაზე მეტადაა გავრცელებული, რადგან ის ხანმოკლეა და ადვილია პროცესის ავტომატიზება. თუმცა, რამდენიმე კვლევამ აჩვენა, რომ მცენარეული სუბსტრატის მყარფაზოვანი ფერმენტაცია უფრო ეფექტიანია და გარემოსდაცვითი ხასიათისაა (El-blendary, 2006; Zhang et al., 2014). მყარფაზოვანი ფერმენტაციის უპირატესობას სიღრმულ პროცესთან შედარებით წარმოადგენს უფრო მარტივი საწარმოო აღჭურვილობა, დაბალი ინვესტიცია, ფერმენტაციის უფრო მაღალი ეფექტიანობა და საბოლოო პროდუქციის კონცენტრაცია, ჩამდინარე წყლის დაბალი მოცულობა, ლიგნოცელულოზადამშლელი მიკროორგანიზმების პოტენციალის გამოყენების შესაძლებლობა. თუმცა, მყარფაზოვანი ფერმენტაცია დაკავშირებულია რამდენიმე ტექნოლოგიურ სირთულესთან, როგორიცაა ჟანგბადის მიწოდება აერობული მეტაბოლიზმისათვის, მეტაბოლიზმის დროს წარმოებული სითბოსა და CO_2-ის მოცილება, ზრდის სუბსტრატის ტენიანობის შენარჩუნება. ამის მიზეზი შესაძლებელია იყოს მცენარეული ნედლეულის მყარფაზოვანი ფერმენტაციის გზით პრობიოტიკული ბაცილების წარმოებისთვის მცირე რაოდენობით ჩატარებული კვლევები.

აგრეთვე, აღსანიშნავია, რომ ჩვენს მიერ პირველად ჩატარდა შედარებითი კვლევა *B. amyloliquefaciens* B-1895 მიერ მცენარეული ნედლეულის სიღრმული და მყარფაზოვანი ფერმენტაციის დროს, პრობიოტიკების წარმოებასთან დაკავშირებით. მიღებულმა მონაცემებმა გამოავლინა რამდენიმე ზოგადი თავისებურება. პირველი, ბაქტერიას აქვს უნარი გამოიყენოს სხვადასხვა იაფი ლიგნოცელულოზური ნარჩენი, როგორც ზრდის სუბსტრატი მაღალი გამოსავლიანობით, სპორების წარმოებისათვის. მეორე, სიღრმული ფერმენტაციის მსგავსად, მცენარეული ნედლეულის მყარფაზოვანი ფერმენტაცია არის შესაფერისი მეთოდი. უფრო მეტიც, უმეტესი ტესტირებული ნედლეულისათვის, ის უფრო სასურველია პრობიოტიკული სპორების წარმოებისთვის. მესამე, პროდუცირებული სპორების რაოდენობა მნიშვნელოვნადაა დამოკიდებული მცენარეული სუბსტრატის სახეობაზე. მაგალითად, ტესტირებულ ნედლეულს შორის *B. amyloliquefaciens* B-1895-ის სპორების ყველაზე მაღალი გამოსავლიანობა მოგვცა სიმინდის კაჭეჭმა და ეთანოლის წარმოების ნარჩენმა (შესაბამისად, 4.7 და 3.87 x 10^{11} სპორა/გ ბიომასაზე). და პირიქით, მზესუმზირას შროტი გამოდგა ზრდისთვის ღარიბი სუბსტრატი, სპორების 5-ჯერ დაბალი გამოსავლიანობით. ზრდის სუბსტრატად სიმინდის კაჭეჭის გამოყენების პირობებში გამოვლენილი სპორების გამოსავლიანობის მკვეთრი ზრდა გვაძლევს საშუალებას ვივარაუდოთ, რომ სუბსტრატის ნაწილაკების სტრუქტურამ და ადჰეზიის უნარმა ხელი შეუწყო ბიოფილმის ფორმირებას და საკვები ნაერთებისა და ჟანგბადის ცვლის პროცესს. ასევე, შესაძლებელია ვივარაუდოთ, რომ სიმინდის კაჭეჭი (ქიმიური შემადგენლობა: ცელულოზა - 31%, ჰემიცელულოზა - 37%, პროტეინი - 3.8%, წყლით ექსტრაგირებული ნაერთები - 39%) შეიცავს *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს ზრდისა და ეფექტიანი სპორულაციისთვის ყველა საჭირო კომპონენტს.

საკვები არის ოპტიმიზაციის შემდეგ, პრობიოტიკების წარმოების პროცესის მასშტაბირება წარმოადგენს მნიშვნელოვან ეტაპს. უფრო მეტიც, უნდა დადასტურდეს *Bacillus* spp-ს სპორების მასობრივი პროდუცირების ტექნიკური განხორციელებადობა და უნდა განისაზღვროს კულტივირების ის ოპტიმალური პირობები, რომლებიც ხელს უწყობენ ბაცილების აქტიურ ზრდას და სპორულაციას. შერჩეული ბაცილების ფერმენტიორში კულტივირებისთვის ჩვენს მიერ

გათვალისწინებული იქნა რამდენიმე წინაპირობა. პირველი, ბაქტერიული სპორულაცია ანაერობულ გარემოში არის მნიშვნელოვნად დაბალი, ვიდრე აერობულ პირობებში (Abbas et al., 2014). მეორე, მონტეიროსა და თანაავტორების (Monteiro et al. 2005, 2014) კვლევებმა აჩვენა *B. subtilis* -ის სპორულაციის ეფექტიანობის მნიშვნელოვანი ზრდა, როდესაც ფერმენტაციისას pH იყო 7.5. მესამე, მორევის სიჩქარე 200 ბრუნი/წთ-ში აღმოჩნდა საუკეთესო *B. amyloliquefaciens* B128-ის სპორების მაქსიმალური ოდენობით პროდუცირებისთვის (Tzeng et al., 2008). მეოთხე, ჩვენს მიერ დადგენილი იქნა, რომ ბაცილების ცელულაზას და ქსილანაზას აქვს მაღალი კატალიზური აქტივობა pH-ს ფართო სპექტრის პირობებში (5-დან 7-მდე).

ამ წინაპირობების გათვალისწინებით შემუშავებული იქნა ორსტადიიანი სტრატეგია, სადაც პირველ ეტაპზე კულტივირების პირობები ხელს უწყობდნენ პოლისაქარიდების ჰიდროლიზსა და ბაცილების ზრდას და მეორე ეტაპზე - შაქრების კონცენტრაციის შემცირებას და სპოროგენეზს. ზემოაღნიშნული მიდგომების დანერგვისა და ფერმენტაცის ოპტიმალური პირობების გამო მიღწეული იქნა სპორების მაქსიმალური გამოსავლიანობა - 6.5 x 10^{10} სპორა/მლ და 2.5 x 10^{10} სპორა/მლ, შესაბამისად, *B. subtilis* KATMIRA 1933-ის და *B. amyloliquefaciens* B-1895-ის კულტივირებისას. მიღებული გამოსავლიანობა გაცილებით მაღალია, ვიდრე *Bacillus* spp-ს სპორების გამოსავლიანობის შესახებ ლიტერატურაში არსებული მონაცემები.

აგრეთვე, განხორციელდა მყარფაზოვანი ფერმენტაციის მასშტაბირება სიმინდის კაჭეჭის ან სპირტის წარმოების ნარჩენის პოლიპროპილენის პარკებში ფერმენტაციისას, რამაც უზრუნველყო *B. amyloliquefaciens* B-1895-ის სპორების ყველაზე მაღალი გამოსავლიანობა 1 x 10^{12} სპორა/გ მშრალ ბიომასაზე. აღსანიშნავია, რომ პირველად ჩვენს მიერ ნაჩვენები იქნა ყველის შრატის გამოყენების უპირატესობა სპორაწარმოებისთვის. აღნიშნული ექსპერიმენტების შედეგები წარმოადგენს საინტერესო და იმედისმომცემ მიდგომას. ამ კომერციულად მისაღები და იაფი ნედლეულის (სიმინდის კაჭეჭი, სპირტის წარმოების ნარჩენი და შრატი) კომბინაცია, როგორც საკვები არის ძირითადი კომპონენტები, წარმოადგენს სწორად შერჩეულ სტრატეგიას პრობიოტიკული ბაქტერიის გამოსავლიანობის გაზრდისთვის.

უდაოდ, განხორციელებული კვლევის შედეგები იძლევა იაფი ღირებულების პრობიოტიკების წარმოების შესაძლებლობას მისი მეცხოველეობაში, მათ შორის მეფუტკრეობასა და მეფრინველეობაში გამოყენებისთვის.

6. დასკვნები

- ტესტირებული ბაცილების სპორების მაქსიმალური გამოსავლიანობისთვის გლუკოზა (კონცენტრაციით 5 გ/ლ-მდე) წარმოადგენს ნახშირბადის საუკეთესო წყაროს. გლუკოზის კონცენტრაცია ასრულებს მნიშვნელოვან როლს ბაცილების სპოროგენეზში, კერძოდ, ნახშირბადის წყაროს ამოწურვა ძირითადი სტიმულია ბაცილების სპორულაციისთვის.
- *B. subtilis* KATMIRA 1933 და *B. amyloliquefaciens* B-1895 სპორაწარმოებისათვის იყენებს სხვადასხვა მცენარეულ ნედლეულს, როგორც ზრდის სუბსტრატს. ბაქტერიული კულტურების შედარებით მაღალი ცელულაზური და ქსილანაზური აქტივობა განაპირობებს მცენარეული სუბსტრატის პოლისაქარიდების ჰიდროლიზს მეტაბოლიზირებად შაქრებამდე.
- სიღრმული ფერმენტაციისას სიმინდის კაჭეჭი და მანდარინის ქერქი წარმოადგენენ ზრდის საუკეთესო სუბსტრატებს *B. amyloliquefaciens* B-1895-ის (1.1×10^{10} სპორა/მლ) და *B. subtilis* KATMIRA 1933-ის (5.7×10^{10} სპორა/მლ) სპორების დაგროვებისთვის, შესაბამისად.
- პეპტონი არის აზოტის საუკეთესო წყარო *B. subtilis* KATMIRA 1933-ის სპორების პროდუცირებისთვის სიღრმული ფერმენტაციის დროს, ხოლო კაზეინის ჰიდროლიზატი უზრუნველყოფს *B. amyloliquefaciens* B-1895-ის სპორების მაქსიმალურ გამოსავლიანობას. ორივე ბაქტერიული კულტურისთვის აზოტის ოპტიმალური კონცენტრაცია არის 40 მილიმოლი.
- მყარფაზოვანი ფერმენტაციის დროს *B. amyloliquefaciens* B-1895-ის სპორების პროდუცირებისთვის აზოტის 200 მილიმოლი კონცენტრაცია პეპტონის სახით არის აზოტის საუკეთესო წყარო.
- სიმინდის კაჭეჭის მყარფაზოვანი ფერმენტაციისას სუბსტრატის დისტილირებული წყლის ნაცვლად ყველის შრატით დატენიანებამ გააუმჯობესა *B. amyloliquefaciens* B-1895-ის სპორულაცია და 26%-ით (1.05×10^{12} სპორა/გ-მდე) გაზარდა სპორების გამოსავლიანობა.

- შემუშავებული პრობიოტიკების წარმოების იაფი, უაღრესად პროდუქტიული და კონკურენტუნარიანი ტექნოლოგია *B. subtilis* KATMIRA 1933-ისა და *B. amyloliquefaciens* B-1895-ს კულტივირებისას 7 ლიტრიან ფერმენტიორში უზრუნველყოფს სპორების მაქსიმალური გამოსავლიანობას - 6.5 x 10^{10} სპორა/მლ და 2.5 x 10^{10} სპორა/მლ, შესაბამისად. სიმინდის კაჭეჭის პოლიპროპილენის პარკებში განხორციელმა მყარფაზოვანი ფერმენტაციის მასშტაბირებამ განაპირობა მსოფლიოში სპორების ყველაზე მაღალი გამოსავლიანობა.
- *B. subtilis* KATMIRA 1933-მა და *B. amyloliquefaciens* B-1895-მა *in vitro* პირობებში გამოავლინეს ანტიბაქტერიული მოქმედება ფუტკრის ამერიკული სიდამპლის გამომწვევის *Paenibacillus larvae*-ს მიმართ.
- *B. subtilis* KATMIRA 1933-ს სპორების შემცველმა პრეპარატმა დაავადებულ ფუტკრებში გამოამჟღავნა სამკურნალო-პროფილაქტიკური ეფექტი ფუტკრის ამერიკული სიდამპლის მიმართ.

7. რეკომენდაცია

ამ კვლევის ფარგლებში შემუშავდა სპორაწარმომქმნელი პრობიოტიკების წარმოების კონკურენტუნარიანი, იაფი ღირებულების ეფექტიანი ტექნოლოგიები. მაგრამ, ამ ტექნოლოგიების კომერციალიზებისთვის მიზანშეწონილია პრობიოტიკული პრეპარატების, როგორც ცხოველის საკვების საკვებდანამატის ტესტირება მეცხოველეობის სხვადასხვა მიმართულებით ცხოველების პროდუქტიულობის გაზრდის მიზნით.

8. ბიბლიოგრაფია

Abbas AA, Planchon S, Jobin M, Schmitt P A new chemically defined medium for the growth and sporulation of *Bacillus cereus* strains in anaerobiosis. J Microbiol Methods 105:54–58, 2014

Alippi A.M., Reynaldi F.J. Inhibition of the growth of Paenibacillus larvae, the causal agent of American foulbrood of honeybees, by selected strains of aerobic spore-forming bacteria isolated from apiarian sources. J. Invertebr. Pathol. 91,141–146, 2006

Aureli P., Capurso L., Castellazzi A.M., Clerici M., Giovannini M., Morelli L., Poli A., Pregliasco F., Salvini F., Zuccott G.V. Probiotics and health: An evidence-based review. Pharmacol. Res. 63, 366–376, 2011

Badu, K. R. and T. Satyanarayana. α-Amylase production by thermophilic *Bacillus coagulans* in solid state fermentation. Process Biochem. 30:305-309, 1995.

Bailey MJ, Biely P, Poutanen K Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. J Biotechnol 23:257–270, 1992

Barbosa TM, Serra CR, La Ragione RM, Woodward MJ, Henriques AO Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract. Appl Environ Microbiol 71:968–978, 2005

Benitez L.B., Velho R.V., de Souza da Motta A., Segalin J., Brandelli A. Antimicrobial factor from Bacillus amyloliquefaciens inhibits Paenibacillus larvae, the causative agent of American foulbrood. Arch. Microbiol. 194, 177–185, 2012

Bohmer, B.M., W. Kramer and D.A. Roth-Maier, Dietary probiotic supplementation and resulting effects on performance, health status and microbial characteristics of primiparous sows. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr., 90: 309-315, 2006

Brashears M.M., Amezquita A., Jaroni D. Lactic acid bacteria and their uses in animal feeding to improve food safety. Adv. Food Nutr. Res. 50, 1–31, 2005

Brodsgaard C.J., Hansen H., Ritter W. Progress of Paenibacillus larvae larvae infection in individually inoculated honeybee larvae reared singly in vitro, in micro colonies, or in full-size colonies. J. Apicult. Res. 39, 19–27, 2000

Cartman, S. T.; La Ragione, R. M. Spore probotics as animal feed supplements. In *Bacterial Spores: Probiotics and Emerging Applications*; Ricca, E., Henriques, A. O., Cutting, S. M., Eds.; Horizon Scientific Press: London, pp 155-161, 2004

Cartman S.T., La Ragione R.M., Woodward M.J. *Bacillus subtilis* spores germinate in the chicken gastrointestinal tract. Appl. Environ. Microbiol., 5254–5258, 2008

Ceslovas, J. J., Vigilijus and S. Almantas, The effect of probiotic and phytobiotics on meat properties and quality in pigs. Vet. Zootech., 29: 80-84, 2005

Chen K.L., Kho W.L., You S.H., Yeh R.H., Tang S.W., Hsieh C.W. Effects of *Bacillus subtilis* var. natto and *Saccharomyces cerevisiae* mixed fermented feed on the enhanced growth performance of broilers. Poult. Sci. 88, 309–315, 2009

Chen Z.M., Li Q., Liu H.M., Yu N., Xie T.J., Yang M.Y., Shen P., Chen X.D. Greater enhancement of *Bacillus subtilis* spore yields in submerged cultures by optimization of medium composition through statistical experimental designs. Appl Microbiol Biotechnol 85:1353–1360, 2010

Chiou, A.L. and Wu, W.S. Isolation, identification and evaluation of bacterial antagonists against *Botrytis elliptic*a on Lily. J Phytopathol 149, 319–321, 2001

Choi J.Y., Shinde P.L., Ingale S.L, Kim J.S., Kim Y.W., Kim K.H., Kwon I.K., Chae B.J. Evaluation of multi-microbe probiotics prepared by submerged liquid or solid substrate fermentation and antibiotics in weaning pigs. Livestock Science. 138, 144–151, 2011

Choi, J. H., Pichiah, P. B. T., Kim, M. J., and Cha, Y. S. Cheonggukjang, a soybean paste fermented with *B. licheniformis* 67 prevents weight gain and improves glycemic control in high fat diet induced obese mice. J. Clin. Biochem. Nutr. 59, 31–38, 2016

Cutting S.M. *Bacillus* probiotics. Food Microbiol. 28, 214-220, 2011

Das S., Kharkwal S., Pandey S.K., Sen R. Multi-objective process optimization and integration for the sequential and increased production of biomass, lipase and endospores of a probiotic bacterium. Biochemical Engineering Journal 50 77–81, 2010

Das S., Mondal K., Haque S. A review on application of probiotic, prebiotic and synbiotic for sustainable development of aquaculture. Journal of Entomology and Zoology Studies 5(2): 422-429, 2017

De Vries, Y.P., Atmadja, R.D., Hornstra, L.M., de Vos, W.M., Abee, T, Influence of glutamate on growth, sporulation, and spore properties of *Bacillus cereus* ATCC 14579 in defined medium. Appl. Environ. Microbiol. 71, 3248–3254, 2005

Van Dijl JM, Hecker M. *Bacillus subtilis*: from soil bacterium to supersecreting cell factory. Microbial Cell Factories 12:3, 2013

El-blendary, M.A., *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* biopesticides production. J. Basic Microbiol. 46, 158–170, 2006

Elshaghabee FMF, Rokana N, Gulhane RD, Sharma C and Panwar H *Bacillus* as Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives. Front. Microbiol. 8:1490, 2017

Evans J.D., Armstrong T.N. Inhibition of the American foulbrood bacterium, Paenibacillus larvae larvae, by bacteria isolated from honeybees. J. Apicult. Res. 44, 168–171, 2005

FAO/WHO Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report. Rome: Food and Agriculture Organization, 2002

Fayol-Messaoudi D, Berger CN, Coconnier-Polter MH, Lievin-Le MV, Servin AL: pH-Lactic acid-, and non-lactic acid dependent activities of probiotic *Lactobacilli* against *Salmonella enterica* serovar typhimurium. Appl Environ Microbiol, 71:6008-6013, 2005

Feng Y, He Z, Ong SL, Hu J, Zhang Z, Ng WJ Optimization of agitation, aeration, and temperature conditions for maximum b-mannanase production. Enzyme Microbial Technol 32:282–289, 2003

Flesar J., Havlik J., Kloucek P., Rada V., Titera D., Bednar M., Stropnicky M., Kokoska L. In vitro growth inhibitory effect of plant-derived extracts and compounds against Paenibacillus larvae and their acute oral toxicity to adult honeybees. Vet. Microbiol. 145, 129–133, 2010

Flint J.F., Garner M.R. Feeding beneficial bacteria: A natural solution for increasing efficiency and decreasing pathogens in animal agriculture. J. Appl. Poult. Res. 2009, 18, 367–378.

Foligne B., Daniel C., Pot B. Probiotics from research to market: the possibilities, risks and challenges. Current Opinion in Microbiology, 16:284–292, 2013

Forssten S.D, Sindelar C.W., Ouwehand A.C. Probiotics from an industrial perspective. Anaerobe 17 410-413, 2011

Fuller R. Probiotics in man and animals. J Appl Bacteriol, 66:365-378, 1989

Fuller R. Probiotics in human medicine, *Gut,* 32 439–442, 1991

Gaggìa F., Mattarelli P., Biavati B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. International Journal of Food Microbiology 141, S15–S28, 2010

Gao Z., Wu H., Shi L., Zhang X., Sheng R., Yin F., Gooneratne R. Study of *Bacillus subtilis* on growth performance, nutrition metabolism and intestinal microflora of 1 to 42 d broiler chickens. Animal Nutrition 3, 109-113, 2017

Gende L.B., Maggi M.D., Fritz R., Eguaras M.J., Bailac P.N., Ponzi M.I. Antimicrobial activity of Pimpinella anisum and Foeniculum vulgare essential oils against Paenibacillus larvae. J Ess Oil Res, 21, 91–93, 2009

Genersch E., Forsgren E., Pentikainen J., Ashiralieva A., Rauch S., Kilwinski J., Fries I. Reclassification of Paenibacillus larvae subsp. pulvifaciens and Paenibacillus larvae subsp. Larvae as Paenibacillus larvae without subspecies differentiation. Int J Syst Evol Microbiol 56, 501–511, 2006

Genersh E. American foulbrood in honeybees and its causative agent, Paenibacillus larvae. J. Invertebr. Pathol, 103, S10–S19, 2010

Ghani, M., Ansari, A., Aman, A., Zohra, R. R., Siddiqui, N. N., and Qader, S. A. U. Isolation and characterization of different strains of *Bacillus licheniformis* for the production of commercially significant enzymes. Pak. J. Pharm. Sci. 26, 691–697, 2013

Ghose TK Measurement of cellulase activities. Pure Appl Chem 59:257–268, 1987

Ghoneim, M. A. M., Hassan, A. I., Mahmoud, M. G., and Asker, M. S. Effect of polysaccharide from *Bacillus subtilis* sp. on cardiovascular diseases and atherogenic indices in diabetic rats. BMC Complement. Altern. Med. 16:112, 2016

Giacchi, V, Sciacca P, Betta P. Multistrain Probiotics: The Present Forward the Future. In: Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: Bioactive Foods in Health Promotion. Elsevier Inc. 279-302, 2016

Gilchrist, M.J., C. Greko D.B. Wallinga G.W. Beran D.G. Riley and P. S. Thorne. The potential role of concentrated animal feeding operations in infectious disease epidemics and antibiotic resistance. Environ. Health Perspect. 115:313–316, 2007

González, M.J., Marioli J.M. Antibacterial activity of water extracts and essential oils of various aromatic plants against Paenibacillus larvae, the causative agent of American foulbrood. J. Invertebr. Pathol. 104, 209–213, 2010

Hageman, J. H., Shankweiller, G. W., Wall, P. R., Franish, K.; McCowan, G., Cauble, S. M., Grajeda, J., Quinones, C. Single, chemically defined sporulation medium for *Bacillus subtilis*: growth, sporulation, and extracellular protease production. J. Bacteriol. 160, 438-441, 1984

Hoa, N. T.; Baccigalupi, L.; Huxham, A.; Smertenko, A.; Van, P. H.; Ammendola, S.; Ricca, E.; Cutting, S. M. Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophylaxis of gastrointestinal disorders. Appl. Environ. Microbiol. 66, 5241-5251, 2000

Holker, U., Hofer, M., & Lenz, J. Biotechnological advantages of laboratory scale solid-state fermentation with fungi. Applied Microbiology and Biotechnology, 64, 175-186, 2004

Hong H.A., Duc L.H., Cutting S.M. The use of bacterial spore formers as probiotics. FEMS Microbiol. Rev. 29, 813–835, 2005

Hosoi, T., and Kiuchi, K. "Natto – a food made by fermenting cooked soybeans with *Bacillus* subtilis (natto)," in Handbook of Fermented Functional Foods, ed. E. R. Farnworth (Boca Raton, FL: CRC Press), 227–245 2003

Huang, M.K., Choi, Y.J., Houde, R., Lee, J.-W., Lee, B. & Zhao, X. Effects of lactobacilli and an acidophilic fungus on the production performance and immune responses in broiler chickens. Poultry Science, 83: 788–795, 2004

Jia R, Ma Q, Fan Y, Ji C, Zhang J, Liu T, Zhao L The toxic effects of combined aflatoxins and zearalenone in naturally contaminated diets on laying performance, egg quality and mycotoxins residues in eggs of layers and the protective effect of *Bacillus subtilis* biodegradation product. Food Chem Toxicol 90:142–150, 2016

Jin, L.Z., Ho, H.W., Abdullah, N., Jalaludin, S., Digestive and bacteria enzyme activities in broilers fed diets supplemented with *Lactobacillus* cultures. Poultry Science 79, 886–891, 2000

Khochamit, N., Siripornadulsil, S., Sukon, P., and Siripornadulsil, W. Antibacterial activity and genotypic–phenotypic characteristics of bacteriocin producing *Bacillus subtilis* KKU213: potential as a probiotic strain. Microbiol. Res. 170, 36–50, 2015

Krehbiel C.R., Rust S.R., Zhang G., Gilliland S.E. Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: Performance response and mode of action. J. Anim. Sci. 81, 120–132, 2003

Kritas, S.K., A. Govaris, G. Christodoulopouls and A.R. Burriel, Effect of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* Supplementation of Ewe's feed on Sheep Milk Production and Young Lamb Mortality. J. Vet. Med. Ser., 53: 170-173, 2006

Kulpreecha S., Boonruangthavorn A., Meksiriporn B., Thongchul N. Inexpensive fed-batch cultivation for high poly (3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. J. Biosci. Bioeng. 107, 240–245, 2009

La Ragione R.M., Casula G., Cutting S.M., Woodward M.J. *Bacillus subtilis* spores competitively exclude *Escherichia coli* O78:K80 in poultry. Veterinary Microbiology, 79: 133–142, 2001

Lam K.l., Cheung P. C.-K. Non-digestible longchain beta-glucans as novel prebiotics. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre 2 45–64, 2013

Larsen N, Thorsen L, Kpikpi EN, Stuer-Lauridsen B, Cantor MD, Nielsen B, Brockmann E, Derkx PMF, Jespersen L Characterization of *Bacillus* spp. strains for use as probiotic additives in pig feed. Appl Microbiol Biotechnol 98:1105–1118, 2014

Lee, J. H., Nam, S. H., Seo, W. T., Yun, H. D., Hong, S. Y., Kim, M. K., et al. The production of surfactin during the fermentation of cheonggukjang by potential probiotic *Bacillus subtilis* CSY191 and the resultant growth suppression of MCF-7 human breast cancer cells. Food Chem. 131, 1347–1354, 2012

Lee S.H., Ingale S.L., Kim J.S., Kim K.H., Lokhande A., Kim E.K., Kwon I.K., Kim Y.H., Chae B.J. Effects of dietary supplementation with *Bacillus subtilis* LS1–2 fermentation biomass on growth performance, nutrient digestibility, cecal microbiota and intestinal morphology of weanling pig. Animal Feed Sci. Technol. 188, 102–110, 2014

Lei K, Li YL, DY Y, Rajput IR, Li WF Influence of dietary inclusion of Bacillus licheniformis on laying performance, egg quality, antioxidant enzyme activities, and intestinal barrier function of laying hens. Poult Sci 92(9):2389–2395, 2013

Leser, T. D., A. Knarreborg, and J. Worm. Germination and outgrowth of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* spores in the gastrointestinal tract of pigs. J. Appl. Microbiol. 104:1025–1033, 2007

Li L., Xu C.L., Ma Q., Hao K., Jin Z.Y., Li K. Effects of a dried *Bacillus subtilis* culture on egg quality. Poultry Science, 85: 364–368, 2006

Luna, C. L.; Mariano, R. L. R.; Souto-Maior, A. M. Production of a biocontrol agent for crucifers black rot disease. *Braz. J. Chem. Eng. 19*, 133-140, 2002

Mazanko M.S., Gorlov I.F., Prazdnova E.V., Makarenko M.S., Usatov A.V., Bren A.B., Chistyakov V.A., Tutelyan A.V., Komarova Z.B., Mosolova N.I., Pilipenko D.N., Krotova O.E., Struk A.N., Lin A., Chikindas M.L. *Bacillus* Probiotic Supplementations Improve Laying Performance, Egg Quality, Hatching of Laying Hens, and Sperm Quality of Roosters. Probiotics Antimicro. Prot. 10, 367-373, 2018

Mathur S., Singh R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria - a review. Int. J. Food Microbiol. 105, 281-295, 2005

Miller GL Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chem 31:426–428, 1959

Molnár A.K., B. Podmaniczky, P. Kürti, I. Tenk, R. Glávits, GY. Virág, ZS. Szabó. Effect of different concentrations of *Bacillus subtilis* on growth performance, carcase quality, gut microflora and immune response of broiler chickens. Br Poult Sci. 52:658-65, 2011

Monteiro S.M.S, Clemente J.J., Henriques A.O., Gomes R.J., Carrondo M.J.T., Cunha A.E. A Procedure for High-Yield Spore Production by *Bacillus subtilis*. Biotechnol. Prog., 21, 1026-1031, 2005

Monteiro S.M.S., Clemente J.J., Carrondo M.J.T., Cunha A.E. Enhanced Spore Production of *Bacillus subtilis* Grown in a Chemically Defined Medium. Advances in Microbiology, 4, 444-454, 2014

Motta A.S., Cannavan F.S., Tsai S.M., Brandelli A. Characterization of a broad range antibacterial substance from a new Bacillus species isolated from Amazon basin. Arch. Microbiol. 188, 367–375, 2007

Mountzouris K.C., Tsitrsikos P., Palamidi I., Arvaniti A., Mohnl M., Schatzmayr G., Fegeros K. Effects of probiotic inclusion levels in broiler nutrition on growth performance, nutrient digestibility, plasma immunoglobulins, and cecal microflora composition. Poult Sci. 89, 58-67, 2010

Musa H.H., Wu S.L., Zhu C.H., Seri H.I., Zhu G.Q. The Potential Benefits of Probiotics in Animal Production and Health. Journal of Animal and Veterinary Advances 8 (2): 313-321, 2009

O'Hara, M.B. and Hageman, J. Energy and Calcium Ion Dependence of Proteolysis during Sporulation of *Bacillus subtilis* Cells. Journal of Bacteriology, 172, 4161-4170, 1990

Pandey K.R., Vakil B.V. Development of bioprocess for high-density cultivation yield of the probiotic *Bacillus coagulans* and its spores. J. BioSci. Biotechnol. 5(2): 173-181, 2016

Patterson J.A., Burkholderr K.M. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. Poultry Science, 82: 627–631, 2003

Posada-Uribe LF, Romero-Tabarez M, Villegas-Escobar V, Effect of medium components and culture conditions in *Bacillus* subtilis EA-CB0575 spore production. Bioprocess Biosyst Eng 38: 1879–1888, 2015

Prajapati V.S., Trivedi U.B., Patel K.C. A statistical approach for the production of thermostable and alkalophilic alpha-amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* KCP2 under solid-state fermentation. 3 Biotech 5:211–220, 2015

Prazdnova EV, Chistyakov VA, Churilov MN, Mazanko MS, Bren AB, Volski A, Chikindas ML DNA-protection and antioxidant properties of fermentates from *Bacillus* amyloliquefaciens B-1895 and *Bacillus* subtilis KATMIRA1933. Lett Appl Microbiol 61(6):549–554, 2015

Rao YK, Tsay KJ, Wu WS, Tzeng YM Medium optimization of carbon and nitrogen sources for the production of spores from *Bacillus amyloliquefaciens* B128 using response surface methodology. Process Biochem 42:535–541, 2007

Ren H., Su Y., Guo X. Rapid optimization of spore production from *Bacillus amyloliquefaciens* in submerged cultures based on dipicolinic acid fluorimetry assay. AMB Expr 8:21, 2018

Sabaté D.C, Carrillo L., Audisio M.C. Inhibition of Paenibacillus larvae and Ascosphaera apis by *Bacillus subtilis* isolated from honeybee gut and honey samples. Res. Microbiol. 160, 193-199, 2009

Sabaté D.C., Cruz M.S., Benítez-Ahrendts M.R., Audisio M.C. Beneficial effects of Bacillus subtilis subsp. subtilis Mori2, a honey-associated strain, on honeybee colony performance. Probiotics Antimicro. Prot. 4, 39–46, 2012

Samanya M, Yamauchi K Histological alterations of intestinal villi in chickens fed dried *Bacillus subtilis* var. natto. Comp Biochem Phys A 133:95–104, 2002

Sanders, M. E. and J. H. Veld. Bringing a probiotic containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. Antonie van Leeuwenhoek 76: 93-315, 1999

Sanders, M.E., Morelli, L., Tompkins, T.A., Sporeformers as human probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, and *Brevibacillus*. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 2, 101e110, 2003

Sen R., Babu K.S. Modelling and optimization of the process conditions for biomass production and sporulation of a probiotic culture, Proc. Biochem. 40 2531–2538, 2005

Sen S, Ingale SL, Kim YW, Kim JS, Kim KH, Lohakare JD, Kim EK, Kim HS, Ryu MH, Kwon IK, Chae BJ. Effect of supplementation of *Bacillus subtilis* LS 1-2 to broiler diets on growth performance, nutrient retention, caecal microbiology and small intestinal morphology. Research in Veterinary Science 93 264–268, 2012

Senesi, S. *Bacillus* spores as probiotics products for human use. In: Bacterial Spores: Probiotics and Emerging Applications; Ricca, E., Henriques, A. O., Cutting, S. M., Eds.; Horizon Scientific Press: London, pp 132-141, 2004

Setlow, P., Johnson, E.A. Spores and their significance. Curr. Opin. Microbiol. 6, 550–556, 2007

Shi F, Zhu Y Application of statistically based experimental designs in medium optimization for spore production of *Bacillus subtilis* from distillery effluent. BioControl 52:845–853, 2007

Shim, Y.H., Shinde, P.L., Choi, J.Y., Kim, J.S., Seo, D.K., Pak, J.I., Chae, B.J., Kwon, I.K., Evaluation of multi-microbial probiotics produced by submerged liquid and solid substrate fermentation methods in broilers. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 23, 521–529, 2010

Siu-Rodas Y., de los Angeles Calixto-Romo M., Guillén-Navarro K., Sánchez J.E., Zamora-Briseño J.A., Amaya-Delgado L. *Bacillus subtilis* with endocellulase and exocellulase activities isolated in the thermophilic phase from composting with coffee residues. Rev. Argent. Microbiol. 50:234-243, 2018

Slieman, T.A. and Nicholson, W.L. Role of Dipicolinic Acid in Survival of *Bacillus subtilis* Spores Exposed to Artificial an Solar UV Radiation. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 1274-1279, 2001

Soccol C.R., Vandenberghe L.P.S., Spier M.R., Medeiros A.B.P., Yamaguishi C.T., Lindner J.D., Pandey A., Thomaz-Soccol V. The Potential of Probiotics, Food Technol. Biotechnol. 48 (4) 413–434, 2010

Sonenshein AL Control of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. Curr Opin Microbiol 3:561–566, 2000

Tanaka, K., Takanaka, S., and Yoshida, K. I. A second-generation *Bacillus* cell factory for rare inositol production. Bioengineered 5, 331–334, 2014

Tavares M, Souza R, Luiz W, Cavalcante RM, Casaroli C, Martins E, Ferreira RC, Ferreira LS *Bacillus subtilis* endospores at high purity and recovery yields: optimization of growth conditions and purification method. Curr Microbiol 66:279–285, 2013

Thirabunyanon M, Thongwittaya N. Protection activity of a novel probiotic strain of *Bacillus subtilis* against *Salmonella Enteritidis* infection. Research in Veterinary Science 93 74–81, 2012

Tuohy KM, Pinart-Gilberga M, Jones M, Hoyles L,McCartneyAL, Gibson GR Survivability of a probiotic *Lactobacillus casei* in the gastrointestinal tract of healthy human volunteers and its impact on the faecal microflora. J Appl Microbiol 102:1026–1032, 2007

Turnbull, P. C. B., J. Kramer, and J. Melling. *Bacillus*. In: W. W. C. Topley and G. S. Wilson (ed.), Topley and Wilson's principles of bacteriology, virology and immunity, 8th ed., vol. 2. Edward Arnold, London, United Kingdom, p. 188–210, 1990

Tzeng Y.-M., Rao Y.K., Tsay K.-J., Wu W.-S. Effect of cultivation conditions on spore production from *Bacillus amyloliquefaciens* B128 and its antagonism to *Botrytis elliptica*. J. Appl. Microbiol. 104, 1275–1282, 2008

Ushakova NA, Brodskiĭ ES, Kozlova AA, Nifatov AV Anaerobic solid-phase fermentation of plant substrates by *Bacillus* subtilis. Prikl Biokhim Mikrobiol 45(1):70–77, 2009

Wangka-Orm C, Deeseenthum S, Leelavatcharamas V Low cost medium for spore production of *Bacillus* KKU02 and KKU03 and the effects of the produced spores on growth of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii* de Man). Pak J Biol Sci 17: 1015–1022, 2014

Warriner, K.; Waites, W. M. Enhanced sporulation in *Bacillus subtilis* grown on medium containing glucose: ribose. Lett. Appl. Microbiol., 29, 97-102, 1999

Wang Y., Cho J.H., Chen Y.J., Yoo J.S., Huang Y., Kim H.J., Kim I.H. The effect of probiotic BioPlus 2B® on growth performance, dry matter and nitrogen digestibility and slurry noxious gas emission in growing pigs. Livestock Science, 120, 35–42, 2009

Ying W., Zhu R., Lu W., Gong L. A new strategy to apply *Bacillus subtilis* MA139 for the production of solid-state fermentation feed. Letters in Applied Microbiology 49, 229–234, 2009

Yu, G.Y., Sinclair, J.B., Hartman, G.L. and Bertagnolli, B.L. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. Soil Biol Biochem 34, 955–963, 2002

Zhang Y.R., Xiong H.R., Guo X.H. Enhanced viability of *Lactobacillus reuteri* for probiotics production in mixed solid-state fermentation in the presence of *Bacillus subtilis.* Folia Microbiol. 59, 31-36, 2014