



EESTI VABARIIK
PATENDIAMET

(11) **EE 05746 B1**

(51) Int.Cl.
A23K 3/02 (2013.01)
C12R 1/25 (2013.01)

(12) **PATENDIKIRJELDUS**

<p>(21) Patenditaotluse number: P201300027</p> <p>(22) Patenditaotluse esitamise kuupäev: 30.07.2013</p> <p>(24) Patendi kehtivuse alguse kuupäev: 30.07.2013</p> <p>(43) Patenditaotluse avaldamise kuupäev: 16.03.2015</p> <p>(45) Patendikirjelduse avaldamise kuupäev: 15.05.2015</p> <p>(83) Bioloogilise aine, sh mikroorganismi tüve deponeerimise andmed: NCIMB 42150 29.05.2013 NCIMB</p>	<p>(73) Patendiomanik:</p> <p>OÜ Tervisliku Piima Biotehnoloogia Arenduskeskus Kreutzwaldi 1, 51014 Tartu, EE</p> <p>(72) Leiutise autorid:</p> <p>Andres Olt Sangla 25-8, 50407 Tartu, EE</p> <p>Helgi Kaldmäe Kreutzwaldi 40-8, 51006 Tartu, EE</p> <p>Olav Kärt Lõhe 28, 13516 Tallinn, EE</p> <p>Meelis Ots Tammsaare 5-13, 51006 Tartu, EE</p> <p>Epp Songisepp Tähe 105-7, 50107 Tartu, EE</p> <p>Merle Rätsep Alasi 31-49, 50109 Tartu, EE</p> <p>Kristiina Kokk Ringtee 31, Tõrvandi, Ülenurme vald, 61715 Tartu maakond, EE</p> <p>Jelena Stsepetova Muru 12-28, 50303 Tartu, EE</p> <p>Siiri Kõljalg Elva 6, 50404 Tartu, EE</p> <p>(74) Patendivolinik:</p> <p>Arno Anijalg Patendibüroo Ustervall OÜ Kivi 21-6, 51009 Tartu, EE</p>
--	--

(54) **Mikroorganism *Lactobacillus plantarum* TAK 59 NCIMB42150 ja selle kasutamine**

(57) Leiutis käsitleb isoleeritud mikroorganismi tüve *Lactobacillus plantarum* TAK 59 NCIMB42150, mida kasutatakse sööda fermenteerimise kiirendamiseks, piimhappe kontsentratsiooni suurendamiseks, pH langetamiseks ja seeläbi sööda toitainete kadude vähendamiseks. *L. plantarum* TAK 59 alandab ammoniaaklämmastiku ja vöihappe kontsentratsiooni söödas. Mikroorganismi kasutamine sileerimisel pärsib proteolüütiliste ja patogeensete mikroorganismide (klostriidide ja enteropatoogeenide) toimet söödas. *Lactobacillus plantarum* TAK 59 sobib kasutamiseks nii kergesti, keskmiselt kui raskesti sileeritava haljasmassi korral sööda säilimisaja pikendamiseks.

(57) The invention provides the isolated microorganism *Lactobacillus plantarum* TAK 59 NCIMB42150, which is used for accelerating the fermentation of feed, increasing the concentration of lactic acid and reducing pH, hence decreasing the loss of nutrients in feed. *L. plantarum* TAK 59 decreases the concentration of ammonia nitrogen and butyric acid in feed. Usage of the microorganism in ensiling suppresses the function of proteolytic and pathogenic microorganisms (enteropathogens and clostridia) in feed. *Lactobacillus plantarum* TAK 59 can be used as silage additive in easy, moderately difficult and difficult to ensile forage for prolonging the storage life of feed.

MIKROORGANISM *LACTOBACILLUS PLANTARUM* TAK 59 NCIMB42150 JA SELLE KASUTAMINE

TEHNIKAVALDKOND

Leiutis kuulub biotehnoloogia valdkonda ning leiab kasutamist sööda valmistamisel. Leiutis käsitleb mikrobioloogilist silokindlustuslisandit ning selle kasutamist sööda fermenteerimise kvaliteedi ja seeläbi sööda kvaliteedi tõstmiseks.

TEHNIKA TASE

10 Tänapäevases kõrge piimatoodanguga täpispidamisega farmis on möödapääsmatu tagada loomadele aastaringne kvaliteetne põhisööt. Selliseks söödaks on kujunenud silo. Silo on fermenteeritud sööt, mis on saadud kõrge niiskusesisaldusega taimse materjali sileerimisel

15 kontrollitud fermentatsiooni tingimustes (McDonald, P., Henderson, A. R., Heron, S.J.E. 1991. The biochemistry of silage. 2nd ed. Chalcombe Publications, Marlow, Bucks UK, p. 340). Lisaks kõrreliste ja libliköielistele silokultuuridele fermenteeritakse teravilja, tervik-

20 koristatud teravilja (sh mais), alkoholi- ja suhkrutööstuse kõrvalsaadusi (n praak, raba, pulp) jne.

Sileerimine on mitmete erinevate keemiliste ja mikrobioloogiliste protsesside ning nende koosmõjude kompleks. Sööda looduslikku fermentatsiooni on keeruline

25 kontrollida. Kuid sileerimise all mõeldakse hapniku juuresolekuta toimunud piimhappelist fermentatsiooni (Rooke, J., A. and Hatfield, G., D., 2003. Biochemistry of Ensiling. In: Silage Science and Technology. D. R. Buxton, R. E. Muck, and J. H. Harrison, eds. American Society of

30 Agronomy, Madison, Wisconsin, USA. pp. 95-139). See tähendab, et mikroorganismid, soovitatavalt piimhappebakterid, fermenteerivad veeslahustuvaid süsivesikuid anaeroobsetes tingimustes orgaanilisteks hapeteks. Sobivates tingimustes toodetakse fermentatsiooni protsessil

peamiselt piimhapet ning silo pH hakkab langema. pH alanemine surub alla mittesoovitud mikroorganismide toime ning selle tulemusena sööt säilib. Mida kiiremini silo pH tase langeb 4 juurde, seda kiiremini muutub sööt 5 stabiilseks ja seda rohkem toitaineid säilitatakse.

Sileerimise edukus või raskus sõltub sileeritavast taimsest materjalist ja silo valmistamise tehnoloogilistest võtetest. Raskesti sileeritav on madala kuivaine- ja veeslahustuvate süsivesikutesisaldusega ning kõrge 10 puhverdusvõimega taimne materjal (Pahlow, G., Rammer, C., Slottner, D., Tuori, M. Ensiling of legumes. In: Wilkins R. J. and Paul, C. (eds): Legumes Silages for Animal Production - LEGSIL. Braunschweig, FAL, 2002, pp.27-31). Euroopa Komisjoni määruse (EÜ) nr 429/2008 25.04.2008 järgi 15 loetakse raskesti sileeritavaks taimset materjali, milles veeslahustuvate süsivesikute sisaldus on alla 1,5 protsendi, keskmiselt ja kergesti sileeritavaks vastavalt 1,5...3 protsendi ning üle 3 protsendi. Lisaks eelmainitule mõjutab sileerimist ja silo kvaliteeti suures ulatuses ka 20 ilmastik. Halva ilma korral ei ole võimalik heintaimi närvutada, et suurendada nende kuivaine- ja veeslahustuvate süsivesikute sisaldust ning vähendada puhverdusvõimet, st parandada heintaimede sileeritavust. Samuti soosivad rasked sileerimise tingimused mittesoovitud mikroorganismide (nt 25 enteropatoogenid, klostriidid, batsillid, seened, listeria) arengut, mis põhjustab sööda riknemist. Paraku silokultuuride optimaalses kasvufaasis koristamiseaegset ilmastikku me mõjutada ei saa. Samas sõltub silo keemiline koostis peamiselt just heintaimede kasvufaasist ning 30 fermentatsiooni kvaliteedist. Hilises kasvufaasis koristatud heintaimedest valmistatud madala toiteväärtusega silo vähendab loomade toodanguvõimet, kuid riknenud sööta loomadele sööta ei tohi. Seega on silo kvaliteedi hindamiseks esmatähtsad just fermentatsiooninäitajad. Mida

enamate näitajate alusel sileerimise edukust hinnata, seda parema ülevaate sööda kohta saab. Olulisemateks fermentatsiooninäitajateks (pole tähtsuse järjekorras) on etanooli, lenduvate rasvhapete (äädik-, propioon-, võihape jt.) ja piimhappe kontsentratsioon, pH ning ammoniaak-
5 lämmastiku sisaldus üldlämmastikust. See, millised fermentatsiooniproduktid sileerimisel tekivad, sõltub silokultuurist, silo valmistamise tehnoloogilistest võtetest, sileeritava materjaliga hoidlasse sattunud
10 mikroorganismide populatsioonist, hoidla hermeetilisusest jt.

Sileerimisprotsessi positiivses suunas mõjutamiseks kasutatakse silokindlustuslisandeid. Silokindlustuslisandi (*silage additive*) all mõistetakse lisandit, mille
15 kasutamiseiga parandatakse piimhappelist fermentatsiooni ning kiirendatakse pH alanemist sileerimisel ja/või inhibeeritakse taimse materjaliga hoidlasse sattunud mittesoovitud mikroorganismide toimet ning seeläbi välditakse nende elutegevuse tulemusel tekkida võivaid
20 laguprodukte.

Enamlevinud silokindlustuslisandid on ensüümid, suhkrud, happed, soolad, bakterjuuretised jt. (Kung, L., Stokes, M. R., Lin, C. J., 2003. Silage additives. In: Silage Science and Technology. D. R. Buxton, R. E. Muck, and J. H.
25 Harrison, eds. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA. pp. 305-360).

Enamus silokindlustuslisandid ei ole universaalsed, vaid sileeritava materjali või probleemi spetsiifilised. See tähendab, et silokindlustuslisand sobib kas kergesti,
30 keskmiselt või raskesti sileeritavate silokultuuride sileerimiseks, või surub alla seente või klostriidide jt sööda riknemist põhjustavate mikroorganismide toime.

Silokindlustuslisandite kasutamise eesmärk on soodustada soovitud fermentatsiooni ja/või alla suruda mittesoovitud

mikroorganismide toimet ning seeläbi hoida ära toitainete kadusid. Fermentatsiooni pärssivad/piiravad keemilised silokindlustuslisandid, mis sisaldavad happeid, suurendavad sileeritava materjali happesust, või teisi kemikaale, mis

5 inhibeerivad mittesoovitud mikroorganismide elutegevust. Rasketes sileerimise tingimustes kasutatakse tavapäraselt keemilisi silokindlustuslisandeid ning vähe on leidnud tõendamist bioloogilise silokindlustuslisandi positiivne mõju neis tingimustes. Bioloogilised silokindlustus-

10 lisandid, mis sisaldavad suhkruid, ensüüme või piimhappebaktereid, soodustavad fermentatsiooni. Lisades silokindlustuslisandiga piimhappebaktereid, viiakse nende arvukus sileeritavas taimses materjalis domineerivaks. Sellega suurendatakse piimhappebakterite konkurentsivõimet

15 ning kiirendatakse fermentatsiooni kulgu. Piimhappebakterite poolt produtseeritud piimhape viib silohoidlas kiiresti keskkonna happeliseks, konserveerides sööda. Kiire pH alandamine surub maha silos mittesoovitud mikroorganismide (ka proteolüütiliste ja patogeensete

20 mikroorganismide, nt klostriidide, batsillide, listeeriate, enteropatogeenide jt) toime. Selle tulemusena välditakse fermentatsioonil tekkivaid mittesoovitud laguprodukte (nt ammoniaaklämmastik, võihape jt), mis vähendavad loomadel söömust ning põhjustavad tervise probleeme. Samuti pole

25 silos soovitud propioonhape ja kõrge äädikhappesisaldus ning pärmseente poolt toodetud etanool. Hoides ära silo riknemist põhjustavate mikroorganismide elutegevuse, säilitatakse söödas toidained, mida saab realiseerida loomade toodangus. Kuna piimhappebakterid on taimede

30 normaalse mikrofloora osa, siis on piimhappebakteritel baseeruvad silokindlustuslisandid looduslikud tooted, neid on lihtne kasutada, sest erinevalt keemilistest lisanditest ei nõua nad erikäitlemist, samuti ei korrodeeri nad silovalmistamisetehnikat ega ohusta keskkonda. Eelviidatud

35 Euroopa Komisjoni määruses nimetatakse bioloogilisi

silokindlustuslisandeid (silokonservante) tehnoloogilisteks lisanditeks.

Piimhappebakterite kasutamist silo fermenteerimise kvaliteedi tõstmiseks on kirjeldatud mitmetes patenditaotlustes ja patentides.

Euroopa patendis EP0369198 (J.Setälä et al., Valio 1993) kirjeldatakse *Lactobacillus plantarum* DSM 4904 (AIV 755) sisaldavat söödalisandit.

Euroopa patenditaotluses EP0580236 (B.B.Ten et al., Duphar International Research B.V) kirjeldatakse mikroorganismide tüvesid *Lactobacillus plantarum* CBS 342.92 ja CBS 343.92, mis toodavad klostriide vähendavat faktorit, täpsemalt *proteinaceous* faktorit.

Euroopa patendis EP0880323 (S.P.Mann et al., Biotol Ltd 2001) kirjeldatakse *Lactobacillus buchneri* (NCIMB 40788) kasutamist sööda ja silo valmistamisel ebasoovitavate pärmi- ja hallitusseente ning poore moodustavate bakterite allasurumiseks.

Ühendkuningriigi patendis GB2356125 (D.Davies et al, Genus Plc, 2003) kirjeldatakse raskesti sileeritava materjali fermenteerimisel kasutatavaid mikroorganisme *Lactobacillus plantarum* NCIMB 41028 ja *Lactobacillus paracasei* sp.*paracasei* NCIMB 41029. Nimetatud tüved on väikse süsivesikute sisaldusega sileeritavas materjalis võimelised lagundama fruktaane (fruktoosi jääke).

Euroopa patenditaotluses EP2312955 (publ WO2010017568) (E.M.Binder et al, 2010) kirjeldatakse silokindlustuslisandit, mis sisaldab vähemalt kaht järgnevat mikroorganismi *Enterococcus faecium* (DSM 3530), *Lactobacillus brevis* (DSM 19456), *Lactobacillus plantarum* (DSM 19457), *Lactobacillus kefiri* (DSM 19455), *Trichosporon spec. nov.* (DSM 14153), *Trichosporon mucoides* (DSM 14156),

Trichosporon dulcimum (DSM 14162) and *Eubacterium* (DSM 11798), ja suure sisepinnaga (large internal surface area) anorgaanilist ainet, nt alumiiniumsilikaati, ja mis vähendab silos mükotoksiine ja loomadel metaani emissiooni.

- 5 USA patendis US6403084 (Chan R.K-F. et al., Pioneer Hi-Bred International, Inc., 2002) kirjeldatakse silo aeroobse stabiilsuse tõstmiseks homofermentatiivse piimhappebakteri *Lactobacillus plantarum* kasutamist koos heterofermentatiivsete piimhappebakteritega *Lactobacillus buchneri* või
- 10 *Lactobacillus brevis* ning mikroorganismiga *Enterococcus faecium*. Rahvusvahelises patenditaotluses WO2006007395 (Charley R. C et al., Lallemand Animal Nutrition North America, 2006) kirjeldatakse mikroorganismi *Lactobacillus diolivorans* kasutamist silo aeroobse riknemise vältimiseks.
- 15 Probleemiks on see, et enamus silokindlustuslisandid on sileeritava taimse materjali või probleemi spetsiifilised. See tähendab, et silokindlustuslisand sobib kas kergesti, keskmiselt või raskesti sileeritavate silokultuuride sileerimiseks, või surub alla pärm- ja hallitusseente või
- 20 klostriidide jt sööda riknemist põhjustavate mikroorganismide toime.

Käesolevas leiutises pakutav mikroorganismi tüvi ja silokindlustuslisand sobib kergesti, keskmiselt ja raskesti sileeritava taimse materjali sileerimiseks, surudes alla

25 sööda riknemist põhjustavate mikroorganismide toime.

LEIUTISE OLEMUS

Leiutis käsitleb isoleeritud mikroorganismi tüve *Lactobacillus plantarum* TAK 59 NCIMB42150, seda sisaldavat

30 sööta, söödalisandit ja kompositsiooni. Söödaks võib olla fermenteeritud sööt, nt silo. Söödalisandiks on näiteks silokindlustuslisand (*silage additive*). Kompositsiooni teisteks koostisosadeks võivad olla vajalikud abiained.

Leiutise järgmiseks objektiks on nimetatud mikroorganismi kasutamine sööda fermenteerimise kiirendamiseks, sööda piimhappe kontsentratsiooni suurendamiseks, pH langetamiseks ja seeläbi toitainete kadude vähendamiseks ning

5 söödas ammoniaaklämmastiku ja võihappe kontsentratsiooni vähendamiseks.

Lactobacillus plantarum TAK 59 NCIMB42150 sobib kasutamiseks nii kergesti, keskmiselt kui raskesti sileeritava taimse materjali sileerimiseks. *Lactobacillus*

10 *plantarum* TAK 59 NCIMB42150 soodustab piimhappelise fermentatsiooni, mille tulemusena toodetud piimhappe kiirendab silo pH vähendamist.

Leiutis käsitleb ka mikroorganismi kasutamist söödas

15 proteolüütiliste ja patogeensete mikroorganismide toime allasurumiseks. Nimetatud mikroorganismideks on näiteks klostriidid, enteropatogeensed, ja pärmseened. Nimetatud enteropatogeensideks on *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella Enteritidis*, *S. entericaserovar*

20 *Typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, *Enterobacter sakazakii*, *Staphylococcus aureus* jt. Nimetatud klostriidideks on *Clostridium tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. Sporogenes* jt.

Tuginedes antimikroobsete omaduste uuringutele surub

25 *Lactobacillus plantarum* TAK 59 NCIMB42150 alla mittesoovitud mikroorganismide toimet.

Tüvega *Lactobacillus plantarum* TAK 59 NCIMB42150 suunatud piimhappelisel fermentatsioonil toimuva kiire ja ulatusliku pH alanemise tulemusena surutakse alla taime ensüümide ja

30 mittesoovitud proteolüütiliste patogeensete mikroorganismide toime ning nende poolt produtseeritud laguproduktide teke. *Lactobacillus plantarum* TAK 59 NCIMB42150 kasutamisel on silos proteolüütiliste mikroorganismide poolt produtseeritava ammoniaaklämmastiku

35 ja võihappe kontsentratsioonid oluliselt väiksemad

võrreldes kontrollsilos ja keemilise silokindlustuslisandiga valmistatud silo vastavatest näitajatest. Samuti vähendab *Lactobacillus plantarum* TAK 59 NCIMB42150 silos pärmseente poolt produtseeritava etanooli, äädikhappe- ja enterobakterite poolt produtseeritava äädikhappe kontsentratsiooni.

Leiutise järgmiseks objektiks on meetod sööda säilimisaja pikendamiseks mikroorganismi *Lactobacillus plantarum* TAK 59 NCIMB42150 lisamise abil. Produktiivloomade stabiilseks söötmiseks on vaja tagada neile kõrge toiteväärtusega kvaliteetne sööt. Kuna kõrge piimatoodanguga riikides taimede vegetatsioon ei toimu aastaringselt, siis tuleb vajalik sööt konserveerida. Selliseks konserveeritud söödaks on silo, mis saadakse taimse materjali anaeroobsel piimhappelisel fermenteerimisel. Sileeritakse kõrrelisi ja liblikõielisi heintaimi, teravilja, tervikkoristatud teravilja (sh mais), alkoholi- ja sukrutööstuse kõrvalsaadusi (praak, raba, pulp) jne. Lisades *Lactobacillus plantarum* TAK 59 NCIMB42150 sileeritavale taimsele materjalile, kiirendatakse fermentatsiooni, produtseerides rohkem piimhapet ning alandades sööda pH-d. pH alandamine surub alla silos mittesoovitud mikroorganismide toimet, vähendades söödas toitainete kadusid. Kui selliselt fermenteeritud söödas on riknemist põhjustavate mikroorganismide, sh proteolüütiliste ja patogeensete mikroorganismide elutegevus inhibeeritud ja pH püsib muutumatult madal, siis on sööt kvaliteetne, stabiilne ning säilib anaeroobsetes tingimustes mitmeid kuid. Eeltoodu tõttu on võimalik sööda säilimisaja pikenemine.

Mikroorganismi *Lactobacillus plantarum* TAK 59 NCIMB42150 lisatakse söödale arvestusega $1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ pmü/g fermenteeritava sööda kohta.

TÜVE KIRJELDUS

- Leiutise objektiks olev *Lactobacillus plantarum* TAK 59 NCIMB42150 tüvi isoleeriti Eestis Pärnumaal ilma
- 5 kindlustuslisaneid kasutamata naturaalselt sileeritud libliköielisest (>75 protsenti) silost. Laktobatsillide kvantitatiivse koostise väljaselgitamiseks siloproovist tehti lahustest lahjenduste rea meetodil alaneva tiheduse astmetega suspensioon füsioloogilises lahuses (0,9
- 10 protsenti NaCl) ning teostati väljakülvid Rogosa agarile (OXOID, U.K.), mida inkubeeriti temperatuuril 37°C anaeroobses keskkonnas (termostaat IG 150, Jouan, Prantsusmaa) 48 tundi. Väljakasvanud mikroobipesad kirjeldati, loendati ja määrati mikroobide üldhulk.
- 15 Mikroobide morfoloogia kirjeldamiseks tehti Grami järgi värvitud preparaadid ja mikroskopeeriti. Leiutise objektiks olev tüvi isoleeriti *Lactobacillus* sp iseloomuliku pesa- ja rakumorfoloogia alusel. Järgnes provisoorne ja seejärel täpsem identifitseerimine, mida järgnevalt kirjeldatakse.
- 20 *Lactobacillus plantarum* TAK 59 NCIMB42150 tüvi deponeeriti mikroorganismide patendiekspertiisiks deponeerimise rahvusvahelise tunnustamise Budapesti lepingu kohaselt Ühendkuningriigis kultuurikollektsioonis National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria (NCIMB)
- 25 numbri NCIMB42150 all 29.mail 2013.

Kultuur-morfoloogilised tunnused on määratud MRS agar ja puljongis (OXOID) kasvatamise järgselt. *Lactobacillus plantarum* TAK 59 NCIMB42150 on korräpärase kujuga eosteta

30 keskmise jämeduse ja pikkusega Gram-positiivne pulkbakter, mille üksikrakud asetsevad üksikult või paariti.

Füsioloogilis-biokeemilised tunnused

Mikroobitüve TAK 59 NCIMB42150 kultiveerimiseks sobib MRS

35 puljong 24-48 tundi mikroaeroobses keskkonnas, mille järel

ilmneb puljongis ühtlaselt hägune kasv. Pärast 48 tunnist MRS agarsöötmele kultiveerimist 37°C juures mikroaeroobses keskkonnas (CO₂/O₂/N₂: 10/5/85 protsenti) on mikroobipesad 1-2,5 mm läbimõõduga, valged, kumerad, läikivad ja korrapärase äärisega.

Tüve optimaalne kasvutemperatuur on 37°C; tüvi paljuneb ka 15°C, ei paljune 45°C juures. Optimaalse kasvukeskkonna pH on 6,5.

- 10 *Lactobacillus plantarum* TAK 59 NCIMB42150 tüvi on katalaas- ja oksüdaasnegatiivne, fakultatiivselt heterofermentatiivne, ei hüdrolüüsi arginiini ja ei produtseeri glükoosi fermentatsioonil gaasi.
- 15 *Lactobacillus plantarum* TAK 59 NCIMB42150 identifitseeriti biokeemilise aktiivsuse alusel API 50CHL System (bioMérieux, Prantsusmaa) test-kiti abil kui *Lactobacillus plantarum* (Kattuvus tüüptüvega: excellent, ID protsenti-99,9, T index -1,0).
- 20 Samastamine sekveneerimisel: *Lactobacillus plantarum* (16S rRNA sarnasus tüüptüvega: 99 protsenti).

Lactobacillus plantarum TAK 59 NCIMB42150 süsivesikute fermentatsiooniprofiil API CHL 50 alusel on alljärgnev.

- 25 Tüvi fermenteerib: L-arabinoosi, riboosi, D-galaktoosi, D-glükoosi, D-fruktoosi, D-mannoosi, D-mannitooli, D-sorbitooli, metüül- α D-mannopüranosiidi, N-atsetüülglükoosamiini, amügdaliini, arbutiini, eskuliini, salitsiini, tsellobioosi, maltoosi, D-laktoosi, D-melibioosi, D-sahharoosi, D-trehhaloosi, D-meletsitoosi, D-rafinoosi, gentibioosi, D-turanoosi, K-glükonaati.
- 30

Resistentsus antibiootikumidele

Metoodika: *Lactobacillus plantarum* TAK 59 NCIMB42150 antibakteriaalsed tundlikkust antibiootikumidele testiti E-testi abil (AB Biodisk, Solna). Minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon määrati vastavalt Euroopa Toiduohutusameti (EFSA) soovitatud epidemioloogilistele murdepunktidele.

Tabel 1. *Lactobacillus plantarum* TAK 59 NCIMB42150 antibakteriaalne tundlikkus

Antibiootikum	<i>Lactobacillus plantarum</i> TAK 59 murdepunkt (cut-off value) (mg/L)	Referentsväärtused*
Ampitsilliin	0,047	2
Gentamütsiin	2	16
Streptomütsiin	16	64
Erütromütsiin	0,19	1
Klindamütsiin	0,5	1
Tetratsükliin	6	8
Kloramfenikool	3	4
Kanamütsiin	32	32

*Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance EFSA Journal 2012;10(6):2740

Mikroobitüvi loetakse tundlikuks, kui selle kasv inhibeerub võrdse või madalamal kontsentratsioonil konkreetse antimikroobse ühendi murdepunktist (cut-off value) ($S \leq x$ mg/L).

Mikroobitüvi loetakse resistentseks, kui selle kasv inhibeerub kõrgemal kontsentratsioonil konkreetse antimikroobse ühendi murdepunktist ($R > x$ mg/L).

Lactobacillus plantarum TAK 59 NCIMB42150 tüvel ei esinenud resistentsust uuritud antibiootikumide suhtes (Tabel 1).

TÜVE FUNKTSIONAALSED OMADUSED

Lühikese ahelaga rasvhapete profiil

Metoodika: 24 t vanune MRS agaril kasvatatud *Lactobacillus plantarum* tüvi TAK59 NCIMB42150 suspendeeriti füsioloogilises lahuses McFarlandi standardid järgi 10^9 mikroobi/ml, 0,5 ml külvati PYG söötmesse (á 4,65 ml) ning inkubeeriti mikroaeroobselt (10 protsenti CO₂) termostaadis 37°C juures 24 ja 48 tundi.

Lühikese ahelaga rasvhapete profiil määrati gaaskromatograafia HP 6890 Series GC System, kasutati kapillaarkoloni HP-INNOWax (15 m x0,25 mm; 0,15 µm). Koloni temperatuuri programm 60°C 1 min, 20°C/min 120°C 10 min, detektor (FID) 250°C (Tabel 2).

Tabel 2. Äädikhappe, piimhappe ja merivaikhappe kontsentratsioon (g/l) PYG söötmes *Lactobacillus plantarum* TAK 59 NCIMB42150 mikroaeroobsel kultiveerimisel 24 ja 48 t jooksul

	Lühikese ahelaga rasvhapped (g/l)					
	äädikhape		piimhape		merivaikhape	
	24 h	48 h	24h	48h	24h	48h
<i>L.plantarum</i> TAK 59	0.081	0.131	1.244	1.352	0.061	0.069

20 Antimikroobne aktiivsus taimset päritolu laktobatsillidele ja patogeenidele

Laktobatsilli antimikroobsete omaduste hindamiseks patogeenide vastu kasutati joonkülvitehnikat (Hutt P, Shchepetova J, Loivukene K, Kullisaar T, Mikelsaar M.

25 Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens. J Appl Microbiol. 2006; 100(6):1324-32).

Sihtmikroobide inhibitsiooni määramiseks mõõdeti kasvuvaba tsoon millimeetrites. Analoogselt Hütt jt. (2006) järgi arvutati kasutatud valimi tulemuste põhjal aritmeetiline keskmine ning standardviga (Tabel 3) ja sellest lähtuvalt hinnati tüvede antagonistlikku aktiivsust (mm) järgnevalt:

nõrk <20,9; keskmine 21,0-23,9; tugev>24;
 inhibitsioonitsoon anaeroobses keskkonnas (mm-s): nõrk <20,9; keskmine 21,0-22,9; tugev>23.

10 Tabel 3. *Lactobacillus plantarum* TAK59 NCIMB42150 antimikroobne aktiivsus taimset päritolu laktobatsillidele ja patogeenidele modifitseeritud MRS agarsöötmeel joonkülvi meetodil (sihtmikroobi kasvupidurdus mm) mikroaeroobses (10 protsenti CO₂) ja anaeroobses (CO₂/N₂/H₂: 5/90/5 protsenti) keskkonnas

Patogeen	Kasvupidurdustsoon (mm)	
	mikroaeroobne	anaeroobne
<i>Lactobacillus</i> spp	9,9 ± 2,3	16,1 ± 1,3
<i>Listeria monocytogenes</i>	22,9 ± 1,83	21,17 ± 1,33
<i>Yersinia enterocolitica</i>	27,2 ± 2,46	24,25 ± 2,06
<i>Salmonella enteritidis</i>	23,25 ± 1,06	22,7 ± 0,51
<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium	21,87 ± 1,45	21,5 ± 0,55
<i>Shigella sonnei</i>	16,93 ± 2,46	23,0 ± 1,41
<i>Escherichia coli</i>	23,12 ± 1,41	21,8 ± 0,75
<i>Enterobacter sakazakii</i>	23,3 ± 0,95	22,5 ± 1,22
<i>Staphylococcus aureus</i>	22,93 ± 2,01	22,67 ± 1,5
<i>Enterococcus faecalis</i>	21,81 ± 1,87	21,16 ± 0,98

Inhibitsioonitsoon mikroaeroobses keskkonnas (mm-s): nõrk <20,9; keskmine 21,0-23,9; tugev>24.

Inhibitsioonitsoon anaeroobses keskkonnas (mm-s): nõrk <20,9; keskmine 21,0-22,9; tugev>23.

Antimikroobset aktiivsust klostriidide vastu määrati järgmiselt.

- Eraldati 24tundi Brain Heart Infusion (BHI) puljongis inkubeeritud *Lactobacillus plantarum* TAK59 NCIMB42150 supernatant. Filtreerimise teel steriliseeritud supernatanti või steriilsesse BHI puljongisse (positiivne kontroll) lisati klostriidide suspensioon. Tulemusi hinnati 48 tunni pärast OD_{620nm} juures. Klostriidide CD kasvuinhibitsioon (protsenti) arvutati järgnevalt = $100 - (OD_t \times 100 / OD_c)$, millest
- 10 OD_t - supernatant lisatud
 OD_c - supernatanti pole lisatud

- Lactobacillus plantarum* TAK59 NCIMB42150 produtseeritud antimikroobsed ühendid inhibeerivad taimset päritolu klostriidide kasvu 19,81 protsendi võrra.

JOONISTE LOETELU

- 20 Joonis FIG 1 - Kergesti sileeritava taimse materjali fermentatsiooni kvaliteedi parandamine *L.plantarum* tüvega TAK 59 NCIMB42150, kus a - etanool, g/kg kuivaines; b - äädikhape, g/kg kuivaines; c - propioonhape, g/kg kuivaines; d - võihape, g/kg kuivaines; e - piimhape, g/kg kuivaines; f - pH; g - ammoniaaklämmastik üldlämmastikust, protsenti;

- 30 Joonis FIG 2 - Keskmiselt sileeritava taimse materjali fermentatsiooni kvaliteedi parandamine *L.plantarum* tüvega TAK 59 NCIMB42150, kus a - etanool, g/kg kuivaines; b - äädikhape, g/kg kuivaines; c - propioonhape, g/kg kuivaines; d - võihape, g/kg kuivaines; e - piimhape, g/kg kuivaines; f - pH; g - ammoniaaklämmastik üldlämmastikust, protsenti;

Joonis FIG 3 - Raskesti sileeritava taimse materjali fermentatsiooni kvaliteedi parandamine *L.plantarum* tüvega TAK 59 NCIMB42150, kus a - etanool, g/kg kuivaines; b - äädikhape, g/kg kuivaines; c - propioonhape, g/kg kuivaines; d - võihape, g/kg kuivaines; e - piimhape, g/kg kuivaines; f - pH; g - ammoniaaklämmastik üldlämmastikust, protsenti.

LEIUTISE TEOSTAMISE NÄITED

10 Näide 1. Kergesti sileeritava taimse materjali fermentatsiooni kvaliteedi parandamine mikroorganismiga *Lactobacillus plantarum* TAK 59 NCIMB42150.

Katse viidi läbi punase ristiku ja timuti heintaimiku seguga, suhtega vastavalt 25:75. Veeslahustuvate süsivesikute sisaldus sileeritavas materjalis oli 3,01 protsenti. Haljasmass niideti ja seejärel närvutati 48h. Närvutatud haljasmass koristati, hekseldati ning sellest valmistati katsesilod. Kontrollsilod valmistati ilma silokindlustuslisandita, teisele katsevariandile lisati piimhappebakteri tüve *Lactobacillus plantarum* TAK 59 NCIMB42150 ning kolmas sipelghappel baseeruva keemilise silokindlustuslisandiga, mille koostis oli järgmine: sipelghapet 42,5 protsenti, ammooniumformiaati 30,3 protsenti, propioonhapet 10 protsenti, bensoehapet 1,2 protsenti, etüülbensoaati 1 protsent, vett 15 protsenti. Piimhappebakteri tüve *Lactobacillus plantarum* TAK 59 NCIMB42150 lisati sileeritavale materjalile kontsentratsioonis $1,2 \times 10^5$ pmü/g sileeritava taimse materjali (sööda) kohta. Katsesilod avati peale 100 päevast sileerimist.

Siloproove analüüsiti üldtunnustatud meetodikate järgi (AOAC. 2005. Official methods of analysis of AOAC

International, 18th ed. Association of Official Analytical Chemists International, Gaithersburg, MD, USA).

Kuivainesisalduse määramisel kuivatati siloproov termostaadis 130 °C juures konstantse kaaluni. Toortuhasisalduse leidmiseks põletati siloproovi kuus tundi muhvelahjus temperatuuril 550 °C. Proteiinisaldus määrati analüsaatoriga Kjeltex™ 2300 Kjeldhali meetodil (Nx6,25). Neutraalkiu (neutral detergent fibre, NDF) ja happeki (acid detergent fibre, ADF) määramiseks kasutati Van Soesti jt kirjeldatud meetodit (Van Soest, P. J., Robertson, J. B., Lewis, B. A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. - J. Dairy Sci. 74: 3583-3597) ning kiuanalüsaatorit ANKOM²²⁰. Silos sisalduvate hapete ja etanooli sisalduse määramiseks kasutati gaaskromatograafi Agilent 7890A. Ammoniaaklämmastiku sisaldus üldlämmastikust määrati analüsaatoriga Kjeltex™ 2300. Silo happesus määrati pH-meetriga Hanna Instruments pH 210.

Mikroorganism *Lactobacillus plantarum* TAK 59 NCIMB42150 parandas silo fermentatsiooni võrreldes kontrollsiloga (tabel 4 ja joonis FIG 1). Piimhappebakteri tüve *Lactobacillus plantarum* TAK 59 NCIMB42150 lisamine suurendas silos piimhappesisaldust ning seeläbi langes silo pH 4,1-ni. Sellega pärsiti silos mittesoovitav mikroorganismide toimet, mis väljendus pärmseente poolt produtseeritava etanooli ning äädikhappebakterite ja enteropatoogeenide poolt produtseeritava äädikhappe väiksemas sisalduses. Samuti oli *Lactobacillus plantarum* TAK 59 NCIMB42150 valmistatud silos madalam proteolüütiliste mikroorganismide poolt produtseeritava ammoniaaklämmastiku- ja võihappesisaldus.

Vaatamata käesoleva teostusnäite kergetele sileerimise tingimustele, oli loodusliku piimhappebakterite populat-

siooni toel fermenteerunud silo kvaliteedinäitajad halvemad kindlustuslisandiga *Lactobacillus plantarum* TAK 59 valmistatud silo vastavatest näitajatest.

5 Seega parandas *Lactobacillus plantarum* TAK 59 NCIMB42150 kergesti sileeritavast taimsest materjalist valmistatud silo fermentatsiooni ja seeläbi sööda kvaliteeti. pH ulatuslikum alandamine surus alla mittesoovitud ning riknemist põhjustavate proteolüütiliste mikroorganismide ja enteropatoogeenide toime, vähendades sööda toitainete

10 kadusid. Selliselt fermenteeritud söödas on riknemist põhjustavate mikroorganismide elutegevus inhibeeritud, pH püsib muutumatult madal ning sööt on kvaliteetne ja säilib anaeroobsetes tingimustes mitmeid kuid.

15 Näide 2. Keskmiselt sileeritava taimse materjali fermentatsiooni kvaliteedi parandamine tüvega *Lactobacillus plantarum* TAK 59 NCIMB42150.

Katse viidi läbi timuti ja aruheina heintaimiku seguga, suhtega vastavalt 50:50. Haljasmass niideti ja seejärel

20 närvutati 48h. Närvutatud haljasmass koristati, hekseldati ning sellest valmistati katsesilod. Sileeritava taimse materjali veeslahustuvate süsivesikute sisaldus oli 2,15 protsenti. Kontrollsilod valmistati ilma silokindlustuslisandita, teisele katsevariandile lisati piimhappebakteri

25 tüve *Lactobacillus plantarum* TAK 59 NCIMB42150 ning kolmas sipelghappel baseeruva keemilise silokindlustuslisandiga , mille koostis on järgmine: sipelghapet 76 protsenti, ammoniumformiaati 5,5 protsenti, vett 18,5 protsenti. Piimhappebakteri tüve *Lactobacillus plantarum* TAK 59

30 NCIMB42150 lisati sileeritavale materjalile kontsentratsioonis $2,4 \times 10^5$ pmü/g sileeritava taimse materjali kohta. Katsesilod avati peale 90 päevast sileerimist.

Siloproove analüüsiti näites 1 kirjeldatud meetodikate järgi.

Keskmiselt sileeritavat taimset materjali fermenteerides parandas *Lactobacillus plantarum* TAK 59 NCIMB42150 silo kvaliteeti (tabel 5 ja joonis FIG 2). Ca 36 protsendilise 5 kuivainesisalduse juures saavutati tüvega *Lactobacillus plantarum* TAK 59 NCIMB42150 valmistatud silo pH tasemeks 3,9, samal ajal kui ilma silokindlustuslisandita silo vastav näitaja oli pH 4,2. Silo happesus on otseselt seotud 10 piimhappesisaldusega, mistõttu tüvega *Lactobacillus plantarum* TAK 59 NCIMB42150 valmistatud silo kõrgem piimhappe produktsioon tingis madalama pH taseme. See tähendab, et tüve *Lactobacillus plantarum* TAK 59 NCIMB42150 lisamine kiirendas söödas piimhappelist fermentatsiooni ning samas hoiti ära silo mittesoovitud fermentatsiooniga 15 tekkida võivaid fermentatsiooniprodukte. Seega kiirema fermenteerimise tulemusel olid toitainete kaod silos väiksemad. *Lactobacillus plantarum* TAK 59 NCIMB42150 lisamine vähendas silo etanooli-, äädikhappe-, võihappe- ja 20 ammoniaak-lämmastikuisaldust võrreldes kontrollsiloga. Seejuures võihappesisalduse vähenemine oli ca 5,2 korda ning ammoniaaklämmastiku- ja etanoolisisalduse vähenemine vastavalt ca 1,5 ja 1,8 korda.

Seega parandas *Lactobacillus plantarum* TAK 59 NCIMB42150 25 keskmiselt sileeritavast taimsest materjalist valmistatud silo fermentatsiooni ja seeläbi sööda kvaliteeti. pH ulatuslikum alandamine surus alla mittesoovitud ning riknemist põhjustavate proteolüütiliste mikroorganismide ja enteropatoogeenide toime, vähendades sööda toitainete 30 kadusid. Selliselt fermenteeritud söödas on riknemist põhjustavate mikroorganismide elutegevus inhibeeritud, pH püsib muutumatult madal ning sööt on kvaliteetne ja säilib anaeroobsetes tingimustes mitmeid kuid.

Näide 3. Raskesti sileeritava taimse materjali fermentatsiooni kvaliteedi parandamine mikroorganismiga *Lactobacillus plantarum* TAK 59 NCIMB42150

Et silokindlustuslisand *Lactobacillus plantarum* TAK 59
5 NCIMB42150 toimib ka rasketes sileerimise tingimustes, siis selle tõestuseks viidi vastav katse läbi punase ristiku ja timuti heintaimiku seguga. Heintaimede suhe oli vastavalt 25:75. Haljasmass niideti, hekseldati ning sellest valmistati katsesilod. Koristatud taimse materjali
10 veeslahustuvate süsivesikute sisaldus oli 0,91 protsenti. Kontrollsilod valmistati ilma silokindlustuslisandita, teisele katsevariandile lisati piimhappebakteri tüve *Lactobacillus plantarum* TAK 59 NCIMB42150 ning kolmas
15 sipelghappel baseeruva keemilise silokindlustuslisandiga, mille koostis oli: sipelghapet 42,5 protsenti, ammoniumformiaati 30,3 protsenti, propioonhapet 10 protsenti, bensoehapet 1,2 protsenti, etüülbensoaati 1 protsent, vett 15 protsenti. Piimhappebakteri tüve
20 *Lactobacillus plantarum* TAK 59 NCIMB42150 lisati sileeritavale materjalile kontsentratsioonis $1,2 \times 10^5$ pmü/g rohu (sööda) kohta. Katsesilod avati peale 100 päevast sileerimist.

Siloproove analüüsiti näites 1 kirjeldatud meetodikate järgi.

25 Raskesti sileeritavale taimsele materjalile viitab lisaks madalale kuivaine- ja suhkrutesisaldusele asjaolu, et ilma silokindlustuslisandita valmistatud silo oli väga halbade fermentatsiooni näitajatega (tabel 6 ja joonis Fig. 3). Kontrollsilod sisaldas palju võihapet ja
30 ammoniaaklämmastikku, mis viitab ulatuslikule proteolüüsile fermentatsioonil. Või- ja piimhappesisaldused olid kontrollsilol samas suurusjärgus, millest esimest tuleb pidada liiga kõrgeks ja teist liialt madalaks ning sellist

siloloomadele sööta ei tohi. Seevastu tüvega *Lactobacillus plantarum* TAK 59 NCIMB42150 valmistatud silo sisaldas kaks korda enam piimhapet ning klostriidide poolt produtseeritud vöihappesisaldus oli väike. Raskesti sileeritava taimse materjali sileerimisel langetas *Lactobacillus plantarum* TAK 59 NCIMB42150 silo pH 4,4 juurde, samal ajal kui kontrollsilol pH tase oli 5,1. Samuti olid tüvega *Lactobacillus plantarum* TAK 59 NCIMB42150 valmistatud silol paremad ammoniaaklämmastiku, propioonhappe ja etanooli näitajad võrreldes kontrollsiloga. Piimhappebakteriga TAK 59 NCIMB42150 inokuleeritud silod olid oma kvaliteedilt ühtlased, samal ajal kui kontrollsilol vastavad näitajad varieerusid suurtes piirides. Erinevalt kontrollsilost langes *Lactobacillus plantarum* TAK 59 NCIMB42150 valmistatud silo pH fermenteerimise käigus kiiremini ja suuremas ulatuses, sellega suruti alla mittesoovitud mikroorganismide toime ning vähendati toitainete kadusid silos.

Seega parandas *Lactobacillus plantarum* TAK 59 NCIMB42150 raskesti sileeritavast taimsest materjalist valmistatud silo fermentatsiooni ja seeläbi sööda kvaliteeti. pH ulatuslikum alandamine surus alla mittesoovitud ning riknemist põhjustavate proteolüütiliste mikroorganismide ja enteropatoogeenide toime, vähendades sööda toitainete kadusid. Selliselt fermenteeritud söödas on riknemist põhjustavate mikroorganismide elutegevus inhibeeritud, pH püsib muutumatult madal ning sööt on kvaliteetne ja säilib anaeroobsetes tingimustes mitmeid kuid.

Läbi kõigi kolme näite oli tüvega *Lactobacillus plantarum* TAK 59 NCIMB42150 valmistatud silode pH, piimhappe- ja ammoniaaklämmstikukisisalduse näitajad paremad ka keemilise silokindlustuslisandiga valmistatud silode vastavatest näitajatest. See näitab veelkord *Lactobacillus plantarum*

TAK 59 NCIMB42150 efektiivsust erineva sileeritavuse raskusega silokultuuride sileerimisel.

Tabel 4. Kergesti sileeritava taimse materjali fermentatsiooni kvaliteedi parandamine mikroorganismiga *Lactobacillus plantarum* TAK 59 NCIMB42150

Näitaja	Kontroll		TAK 59		Keemiline	
	Keskmine	SD	Keskmine	SD	Keskmine	SD
Kuivaine, g/kg	381,9	0,8	387,8	6,4	378,2	4,1
Kuivaines, g/kg						
Toorproteiin	157,9	1,8	159,3	1,1	168,0	1,8
Toortuhk	96,6	0,3	93,3	1,4	94,1	0,3
NDF	490,3	5,7	488,3	4,3	472,7	6,5
ADF	356,6	4,3	358,3	13,6	343,1	2,3
Etaanool	8,27	0,25	5,17	0,40	2,13	0,06
Äädikhape	17,30	0,36	15,07	0,32	9,87	0,67
Propioonhape	0,10	0,00	0,10	0,00	1,07	0,12
Võihape	0,10	0,00	0,03	0,06	0,10	0,00
Piimhape	65,03	2,56	73,70	1,30	39,33	0,93
pH	4,3	0,02	4,1	0,01	4,4	0,02
NH ₃ -N/üld N, %	3,03	0,06	2,70	0,00	4,83	0,15

Tabel 5. Keskmiselt sileeritava taimse materjali fermentatsiooni kvaliteedi parandamine mikroorganismiga *Lactobacillus plantarum* TAK 59 NCIMB42150

Näitaja	Kontroll		TAK 59		Keemiline	
	Keskmine	SD	Keskmine	SD	Keskmine	SD
Kuivaine, g/kg	367,3	3,7	363,9	1,0	376,5	0,8
Kuivaines, g/kg						
Toor- proteiin	98,6	0,5	97,9	2,9	95,0	2,3
Toortuhk	72,6	0,9	72,5	0,4	69,8	1,2
NDF	639,0	4,6	633,6	14,5	620,3	2,0
ADF	405,4	5,0	398,1	10,0	401,1	10,3
Etanool	10,47	1,04	5,67	0,40	5,10	0,44
Äädikhape	9,90	0,44	7,87	0,47	3,47	0,06
Propioonhape	0,00	0,00	0,03	0,06	0,00	0,00
Võihape	0,67	0,29	0,13	0,06	0,07	0,06
Piimhape	50,13	1,06	57,90	5,43	11,43	1,62
pH	4,2	0,00	3,9	0,00	4,4	0,15
NH ₃ -N/üld N, %	3,03	0,15	1,97	0,12	2,10	0,10

Tabel 6. Raskesti sileeritava taimse materjali fermentatsiooni kvaliteedi parandamine mikroorganismiga *Lactobacillus plantarum* TAK 59 NCIMB42150

Näitaja	Kontroll		TAK 59		Keemiline	
	Keskmine	SD	Keskmine	SD	Keskmine	SD
Kuivaine, g/kg	132,7	5,0	136,4	1,2	138,5	5,9
Kuivaines, g/kg						
Toorproteiin	153,1	8,3	171,0	2,1	177,2	3,3
Toortuhk	97,4	3,0	93,2	1,1	89,2	3,5
NDF	544,4	23,5	499,7	4,1	517,1	23,2
ADF	383,3	18,1	362,2	8,3	362,3	10,7
Etanool	16,23	1,81	10,53	0,46	4,43	1,00
Äädikhape	21,57	6,79	34,03	0,68	21,67	5,62
Propioonhape	4,23	3,48	0,13	0,06	4,23	3,00
Võihape	30,53	26,33	0,93	0,12	13,03	12,21
Piimhape	34,17	31,87	69,27	6,75	37,73	9,89
pH	5,1	0,4	4,4	0,1	4,6	0,4
NH ₃ -N/üld N, %	10,97	1,93	7,97	0,25	11,40	4,00

PATENDINÕUDLUS

1. Isoleeritud mikroorganismi tüvi *Lactobacillus plantarum* TAK 59 NCIMB42150.
- 5 2. Mikroorganism vastavalt punktile 1 lüofiliseeritud kujul.
3. Punktile 1 - 2 vastavat mikroorganismi tüve sisaldav sööt.
4. Sööt vastavalt punktile 3, milleks on fermenteeritud
10 sööt.
5. Sööt vastavalt punktile 4, milleks on silo.
6. Punktile 1 vastavat mikroorganismi tüve sisaldav kompositsioon.
7. Punktile 1 vastava mikroorganismi kasutamine sööda-
15 lisandina.
8. Punktile 1 vastava mikroorganismi kasutamine sööda fermenteerimiseks.
9. Punktile 1 vastava mikroorganismi kasutamine sööda fermenteerimise kiirendamiseks, söödas piimhappe
20 kontsentratsiooni suurendamiseks, pH alandamiseks ja seeläbi söödas toitainete kadude vähendamiseks ning ammoniaaklämmastiku ja võihappe kontsentratsiooni vähendamiseks.
10. Punktile 1 vastava mikroorganismi kasutamine sööda
25 fermenteerimisel proteolüütiliste ja patogeensete mikroobide toime allasurumiseks, mis seisneb punktile 1 vastava mikroorganismi lisamises fermenteeritavale söödale.
11. Kasutamine vastavalt punktile 9, kus proteo-
30 lüütilisteks ja patogeenseteks mikroobideks on klostriidid ja enteropatogeenid.
12. Meetod sööda säilimisaja pikendamiseks, kus fermenteerimisel lisatakse söödale punktile 1 vastavat mikroorganismi.

1/3

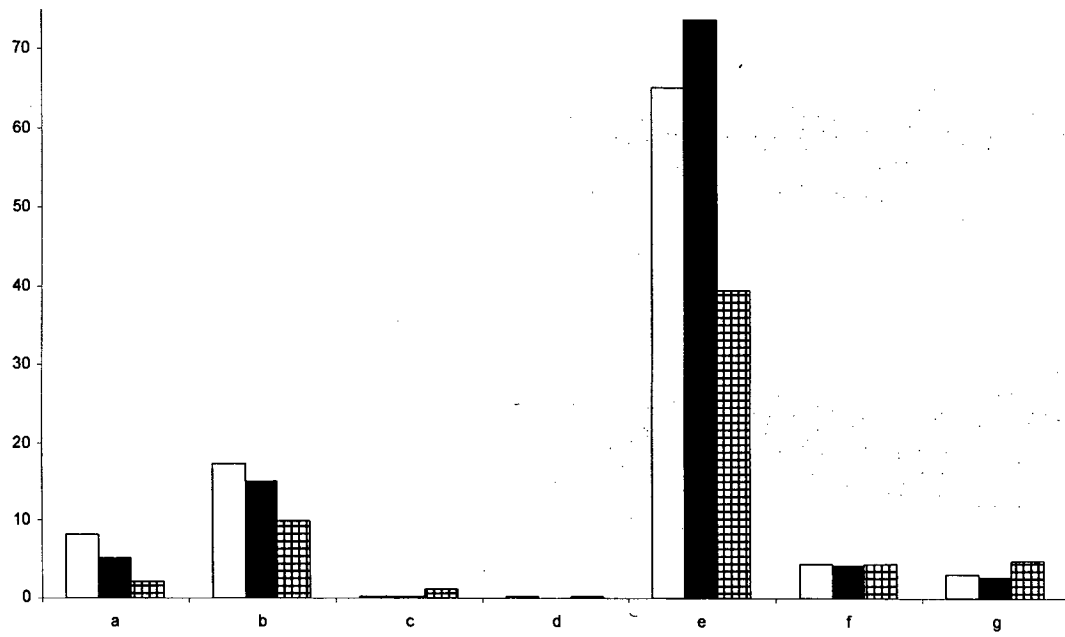


FIG 1

□ - kontroll; ■ - *L.plantarum* TAK 59 NCIMB42150;

▣ - keemiline.

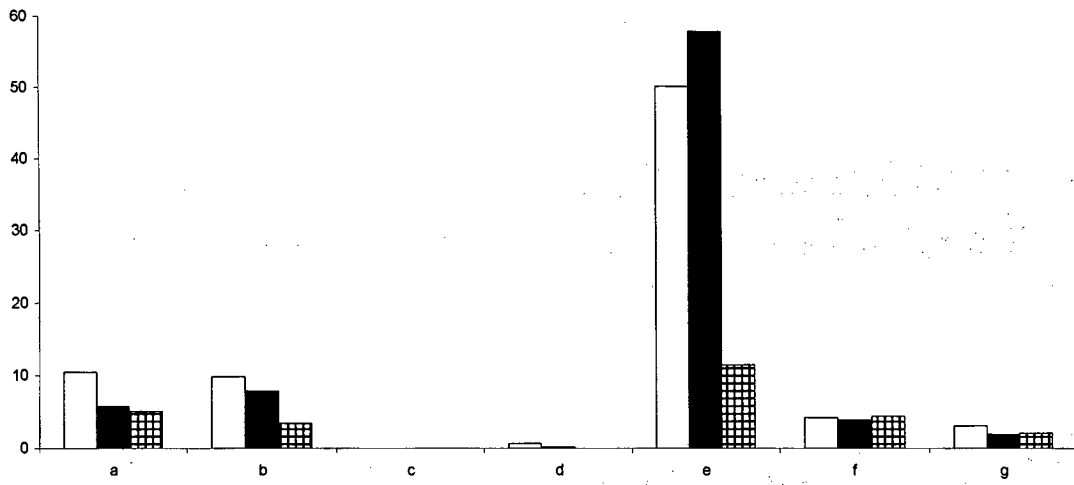


FIG 2

□ - kontroll; ■ - *L.plantarum* TAK 59 NCIMB42150;

▣ - keemiline.

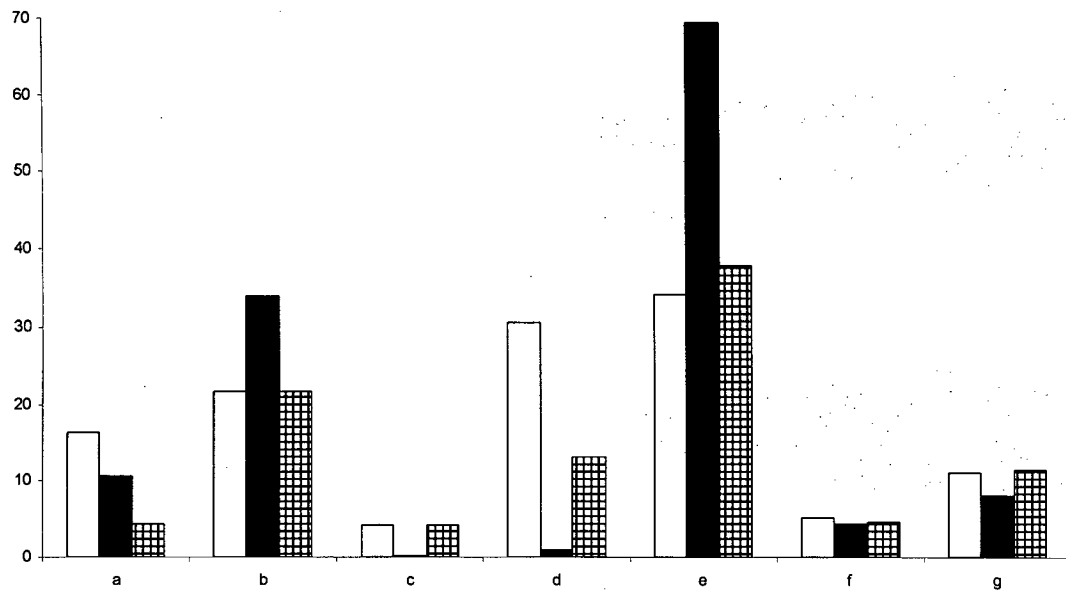


FIG 3

□ - kontroll; ■ - *L.plantarum* TAK 59 NCIMB42150;

▣ - keemiline.