

(12) **PATENDIKIRJELDUS**

<p>(21) Patenditaotluse number: P201800024</p> <p>(22) Patenditaotluse esitamise kuupäev: 27.09.2018</p> <p>(24) Patendi kehtivuse alguse kuupäev: 27.09.2018</p> <p>(43) Patenditaotluse avaldamise kuupäev: 15.05.2020</p> <p>(45) Patendikirjelduse avaldamise kuupäev: 17.08.2020</p> <p>(83) Bioloogilise aine, sh mikroorganismi tüve deponeerimise andmed: DSM 32650, 27.09.2017, DSMZ</p>	<p>(73) Patendiomanik: BioCC OÜ Kreutzwaldi 1, 51014 Tartu, EE</p> <p>(72) Leiutise autorid: Epp Songisepp Tähe 105-7, 50107 Tartu, Tartu maakond, EE</p> <p>Oksana Gerulis Luunja vald, Veibri küla, 62220 Tartu maakond, EE</p> <p>Liina Sadam Rehetare tee 1-15, Ülenurme vald, Soinaste küla, 61709 Tartu maakond, EE</p> <p>Sirje Kuusik Mõisavahe 24-3, 50707 Tartu, EE</p> <p>Merle Muruvee Pikk 82-71, 50606 Tartu, EE</p> <p>Anette Nappa Kalda tee 28-2, 50704 Tartu, EE</p> <p>(74) Patendivolinik: Sirje Kahu Patendibüroo Ustervall OÜ Kivi 21-6, 51009 Tartu, EE</p>
--	---

(54) **Mikroorganismi tüvi *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 ja selle kasutamine**

(57) Leiutis käsitleb isoleeritud mikroorganismi tüve *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 ja selle kasutamist söödalisandina. Tüve kasutatakse raskesti sileeritava, madala kuivainesisaldusega (≤ 20 protsenti) sööda aeroobse stabiilsuse tagamiseks, fermenteerimise parandamiseks, sööda piimhappe ja äädikhappe kontsentratsiooni suurendamiseks, pH alandamiseks ja seeläbi söödas toitainete kadude vähendamiseks. Mikroorganism surub söödas alla patogeensete mikroorganismide ning pärm- ja hallitusseente toimet. Tüve abil saab pikendada raskesti sileeritavast materjalist valmistatud sööda säilimisega.

(57) The invention provides the isolated microorganism strain *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 and its use as microbiological feed additive. The strain is used for ensuring aerobic stability of feed with low dry matter content (≤ 20 percentage) and improving fermentation of feed, for increasing the concentration of lactic and acetic acid in feed and for reducing pH, hence decreasing the loss of nutrients in feed. Usage of the microorganism in ensiling suppresses the function of pathogenic microorganisms (enteropathogens) and yeasts in feed. The strain can be used for prolonging the storage life of feed made from fresh material difficult to ferment.

MIKROORGANISMI TÜVI *LACTOBACILLUS BUCHNERI* BIOCC 203 DSM
32650 JA SELLE KASUTAMINE

5 TEHNIKAVALDKOND

Leiutis kuulub biotehnoloogia valdkonda ning leiab kasutamist sööda valmistamisel. Leiutis käsitleb mikrobioloogilist silokindlustuslisandit ning selle kasutamist sööda aeroobse stabiilsuse tagamiseks, fermenteerimise kvaliteedi ja seeläbi
10 sööda kvaliteedi tõstmiseks.

TEHNIKA TASE

Silo toitainete sisalduse säilitamine on vajalik alates sööda koristamisest ja konserveerimisest kuni sööda tarbimiseni looma poolt.

15 Silo on fermenteeritud sööt, mis on saadud kõrge niiskusesisaldusega taimse materjali sileerimisel 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.
20 340).

Sileerimine on taimse loomasööda säilitamise meetod, mis põhineb piimhappelisel fermentatsioonil anaeroobsetes tingimustes (Rooke, J., A. and Hatfield, G., D., 2003. Biochemistry of Ensiling. In: Silage Science and Technology.
25 D. R. Buxton, R. E. Muck, and J. H. Harrison, eds. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA. pp. 95-139). Silo fermentatsiooni võib jagada nelja faasi: 1) aeroobne faas hoidlas peale koristamist, 2) fermentatsiooni faas, 3) stabiilse hoiustamise faas ja 4) silo väljalaadimise faas,
30 kui hoidla on avatud ja silo puutub kokku õhuga. Kvaliteetse silo valmistamisel on oluline sileeritava materjali õige mikrobiaalne fermentatsioon. Edukas fermentatsioon sõltub ka heintaimede tüübist, kvaliteedist, sileerimisprotsessis

kasutatavatest tehnoloogilistest võtetest, ilmastikust, soovimatute mikroorganismide (nt klostriidide, enteropatoogeenide, listeeriate, batsillide) ja seente (pärm- ja hallitusseente) arengust ning sileeritava materjali 5 kuivainesisaldusest.

Sööda looduslikku fermentatsiooni on keeruline kontrollida, kuna silo fermentatsioon on mitmete erinevate keemiliste ja mikrobioloogiliste protsesside ning nende koosmõjude kompleks.

- 10 Suurem osa silost valmistatakse kuivainesisalduse juures 200-500 g/kg. Sellise sisalduse juures on taime paljud ensüümid sileerimisprotsessil aktiivsed ning neis tingimustes suudavad silos hulgaliselt kasvada nii soovitud kui ka soovimatud mikroorganismid, pärmid ja hallitused. Seega on kogu 15 bioloogilise aktiivsuse kontrolli alla saamine märkimisväärne väljakutse ning seda on võimalik saavutada vaid hästi juhitud sileerimisprotsessi kaudu (Muck, R. E. 2010. Silage microbiology and its control through additives. R. Bras. Zootec. Vol. 39. July).
- 20 Kontrollitud sileerimisprotsessis piimhappebakterid fermenteerivad vees lahustuvaid süsivesikuid piimhappeks. Selle tulemusena sileeritava materjali pH langeb (sileeritav mass hapestub) ning see omakorda surub maha rikkemist põhjustavate mikroorganismide elutegevuse (Oude Elferink, S. 25 J. W. H., Driehuis, F., Gottschal, J. C., Spoelstra, S. F. 2000. Silage fermentation processes and their manipulation. - Journal FAO Plant Production and Protection No 161, pp 17-30). Mida kiiremini langeb silo happesus pH 4 juurde, seda kiiremini ensümaatiline ja mikrobiaalne aktiivsus lakkab, 30 sööt muutub stabiilseks ja rohkem toitaineid säilitatakse.

Juba varem on dokumenteeritud, et silo fermentatsiooni kvaliteeti saab oluliselt parandada piimhappebaktereid sisaldavate lisanditega (McDonald, P., Henderson, A. R., Heron, S.J.E. 1991. The biochemistry of silage. 2nd ed. Chalcombe Publications, Marlow, Bucks UK, p. 340).

Sama tähtis kui toitainete säilitamine silo fermentatsiooni ja hoiustamise faasis, on silo toitainete säilitamine hoidla avamisel. Silo võib olla eksponeeritud hapnikule nii söötmise eesmärgil silohoidla avamisel kui ka hoidla katmisest tingitud vigade tagajärjel.

Kõik silod, puutudes kokku õhuga, riknevad varem või hiljem aeroobsete mikroorganismide aktiivse elutegevuse tulemusena. Lisaks mõjutavad silo aeroobset stabiilsust nii sileeritav silokultuur ja tema koristusaegne kasvufaas, fermentatsiooni biokeemilised ja mikrobioloogilised faktorid, silomaterjali füüsikalised ja silomajanduse korralduslikud faktorid, temperatuur kui ka silokindlustuslisandi valik. Silo aeroobse stabiilsuse näitajaks loetakse aega, kui kaua suudab silo vastu panna aeroobsetele riknemisprotsessidele, st kui kaua püsib silo õhu juurdepääsul kvaliteetsena. Silo aeroobset stabiilsust hinnatakse silo temperatuuri tõusmise kiiruse kaudu. Mida kauem püsib silo temperatuur stabiilne, st silo temperatuur ei ületa ümbritseva keskkonna (ambientset) temperatuuri üle 3°C (Komisjoni Määrus (EÜ) nr 429/2008; DLG-Richtlinien für die Prüfung von Siliermitteln auf DLG-Gütezeichen-Fähigkeit Oktober 2013), seda aeroobselt stabiilsem ja parem on silo. Enamikus aeroobselt riknevates silodes tõuseb temperatuur üle ambientse temperatuuri hapete ja veeslahustuvate süsivesikute mikrobiaalsel oksüdatsioonil süsihappegaasiks ja veeks.

Kuigi anaeroobsetes tingimustes silo madal pH surub maha soovimatute mikroorganismide kasvu, ei ole madal pH

iseenesest piisav aeroobse riknemise ärahoidmiseks. Silo riknemine aeroobsetes tingimustes saab alguse enamasti pärmseentest, kes saavad kasvada ka üsna madala pH juures. Pärmid on suutelised kasvama laias pH-vahemikus (pH 3-8).
5 Optimaalne pH enamiku pärmide kasvuks on 3,5-6,5. Kui silo puutub hoidla avamisel kokku õhuga, siis fermentatsioonil tekkinud happed jt ühendid oksüdeeritakse aeroobsete bakterite, pärmide ja hallituste poolt. Pärmide elutegevuse tulemusena tekib süsinikdioksiid ning see põhjustab silo
10 kuumenemist, mis omakorda on otseselt kuivaine kadude põhjustaja (McDonald, P., Henderson, A. R., Heron, S.J.E. 1991. The biochemistry of silage. 2nd ed. Chalcombe Publications, Marlow, Bucks UK, p. 340).

Pärmseened kasutavad energiaallikana silos olevat
15 jääksuhkrut, kuid esimeses järjekorras eelistavad piimhapet. Seetõttu on aeroobsele riknemisele iseäranis vastuvõtlikud just hästi fermenteerunud silod, milles on palju piimhapet. Pärmseente tegevuse tulemusena hakkab silo pH tõusma ning tekib võimalus aktiveeruda mitmetel teistel aeroobsetel
20 mikroorganismidel ja hallitusseentel. Hästi fermenteerunud toitaineterikkas silos aktiivse mikrobiaalse tegevuse ilminguks on silo temperatuuri tõus.

On leitud (Ohyama, Y., Hara, S. and Masaki, S. (1980) Analysis of the factors affecting aerobic deterioration of
25 grass silages. In Thomas, C. (ed.) Forage conservation in the 80s. BGS Occasional Symposium No. 11, pp. 257-261. Reading, UK: British Grassland Society.), et silo aeroobse stabiilsuse olulised mõjufaktorid on silo kuivaine-, äädik- ja propioonhappesisaldus ning pärm- ja hallitusseente arv
30 silohoidla avamisel. Negatiivne seos kuivainesisalduse ja pärmide osas näitas, et suurem kontsentratsioon põhjustas õhuga kokku puutumisel silo temperatuuri kiirema tõusu. Seevastu äädik- ja võihape näitasid, et nende

fermentatsiooniproduktide suuremat kontsentratsiooni seostati stabiilsema siloga.

Nagu mainitud, silo madalal pH-väärtusel aeroobset riknemist põhjustavatele mikroorganismidele otsest mõju ei ole, kuid erinev tähtsus on silo fermentatsioonil tekkinud hapetel. Pärmete kasvu inhibeerivad dissotseerumata lühikese ahelaga rasvhapped (Pahlow G., Muck R.E., Driehuis F., Oude Elferink S.J.W.H. and Spoelstra S.F. (2003) Microbiology of ensiling. In: Buxton D.R., Muck R.E. and Harrison J.H. (eds) Silage science and technology, pp. 31-93. Madison, WI, USA: Agronomy Publication No. 42, American Society of Agronomy). Dissotseerumata happe molekulid on võimelised läbima mikroobi rakumembraani passiivse difusiooni teel, mille tulemusel vabanevad H⁺ ioonid. See alandab rakusisest pH-d ja selle tagajärjel rakk hukkub. Millises ulatuses mingi hape silos dissotseerub, sõltub happe dissotsatsiooni konstandist (pKa) ja silo pH-st (Zirchrom (2011) Dissociation constants of organic acids and bases. Available at: <http://www.zirchrom.com/organic.htm> (accessed 3 November 2011)). Äädik- ja propioonhape dissotseeruvad vähem kui piimhape, millega on seletatav hästi fermenteerunud piimhappelise silo vastuvõtlikkus aeroobsele riknemisele. Seevastu äädik- ja propioonhape on efektiivsed pärm- ja hallitusseente inhibeerijad. Või happel on sarnane mõju. Või happeline silo on aeroobselt stabiilne, kuid see viitab riknemist põhjustavate klostriidide aktiivsusele. Sellisel silol on suured toitainetekaod ja kõrge või happesisaldus võib loomadel põhjustada terviseprobleeme. Propioonhapet esineb silos harva ja väikestes kogustes ning seda produtseerivate mikroorganismide kontsentratsioon silokultuuridel on väike ja nende konkurentsivõime on madal.

Äädikhappesisaldus silos viitab heterofermentatiivsele käärimisele ning kuna äädikhape on pärmidele väga toksiline, siis sellised silod on tavaliselt aeroobselt väga stabiilsed.

Silo ideaalne fermentatsioon vähendab fermentatsiooni kadusid ning tagab piisava stabiilsuse sööda säilitamisel ja hoidlast väljalaadimisel söötmiseks. Efektiivne silokindlustuslisand, silo valmistamise ja söötmise õige korraldamine mängivad võtmerolli nimetatud eesmärkide täitmisel. Enamik silokindlustuslisandeid on välja töötatud sileerimise protsessi ja sileeritud sööda toiteväärtuse parandamiseks. Kuid silokindlustuslisanditest oodatakse, et nad peale silo kiire fermentatsiooni ja kvaliteedi parandamise suruksid maha ka riknemist (sh aeroobset riknemist) põhjustavate organismide kasvu. Peamised põhjused silokindlustuslisandi kasutamiseks silo aeroobse stabiilsuse parandamisel on ära hoida silo kuumenemine, toitainete kaod ning loomade jõudluse langus, mis võib olla põhjustatud riknenud silo söötmisest.

Silokindlustuslisandites kasutatakse sageli ensüüme, kuid need ei inhibeeri pärme ja hallitusi, mistõttu ensüümidega valmistatud silodel on väga tagasihoidlik aeroobne stabiilsus.

Silo aeroobse stabiilsuse parandamisel on efektiivsed orgaanilised happed, nagu propioon-, äädik- ja bensoehape jt. Neid lisatakse kas suures koguses, et saavutada sööda nn lõplik konserveerimine, või väiksemas koguses. Viimasel juhul küll surutakse maha pärmseente aktiivsus, kuid ei tagata täielikku konserveerimist ja sileerimine sõltub jätkuvalt looduslikust fermentatsioonist. Samuti on leitud ammoniaagi pärssiv mõju aeroobsetele bakteritele ning pärm- ja hallitusseentele. Paraku on orgaanilised happed jt kemikaalid söövitava toimega ning kahjustavad silotehnikat ning nendega ümberkäimisel ja ladustamisel on ranged ohutusnõuded.

Piimhappebakteritel baseeruvaid bioloogilisi silokindlustuslisandeid käsitletakse kui looduslikke produkte ning nende eeliseks on, et nad ei ole toksilised, ei korrodeeri seadmeid ja ei põhjusta keskkonnariske.

5 Piimhappebakterite abil silo pH langetamise eesmärgiks on minimeerida fermentatsioonikadusid. Piimhappebaktereid jaotatakse glükoosi fermentatsiooni alusel kahte rühma: homofermentatiivsed ning heterofermentatiivsed. Homofermentatiivsed piimhappebakterid toodavad ühest moolist
10 glükoosist kaks mooli piimhapet, heterofermentatiivsed bakterid aga toodavad ühe mooli piimhapet, ühe mooli süsinikdioksiidi ja ühe mooli kas etanooli või äädikhapet. Teada on, et käärimisprotsessi alguses domineerivad homofermentatiivsed liigid, kuid hiljem keskkonna
15 happelisemaks muutumisel saavutavad ülekaalu heterofermentatiivsed bakterid (Muck, R. E. 2010. Silage microbiology and its control through additives. R. Bras. Zootec. Vol. 39. July).

20 Homofermentatiivsetel piimhappebakteritel baseeruvad silokindlustuslisandid parandavad silo fermentatsiooni kulgu, kuid enamus selliseid bakterijuuretisi inhibeerivad pärmide ja hallituste kasvu vähe. Võib juhtuda, et sellise silokindlustuslisandi kasutamisel on silo aeroobne stabiilsus
25 väiksem kui ilma kindlustuslisandita silol ning võib isegi suurendada silo kuumenemise riski.

Mõned silojuuretised sisaldavad baktereid (nt propioonhappebaktereid), mis toodavad propioonhapet. Paraku silo aeroobne stabiilsus ei parane, kuna need mikroorganismid
30 pole üldiselt happetolerantsed ja on aeglase kasvuga. Küll aga mõned juuretised, mis produtseerivad lisaks piimhappele suures koguses ka äädikhapet (*L. buchneri*), pärsivad silo aeroobset rikkumist põhjustavaid mikroorganisme (pärm- ja

hallitusseeni jt), st parandavad silo aeroobset stabiilsust ja hoiavad ära silo riknemise hoidla avamisel vm kokkupuutel õhuga.

Heterofermentatiivsete piimhappebakterite lisamine
 5 sileerimisel alandab pH-d ning vähendab kuivainekadusid. Lisaks on mõnedel sellistel tüvedel täheldatud tugevat inhibeerivat toimet pärmide ja hallituste kasvule, tõstes seeläbi silo aeroobset stabiilsust (Jatkauskas, J., Vrotniakiene, V., Ohlsson, C., Lund, B. 2013. The effect of
 10 three silage inoculants on aerobic stability in grass, clover-grass, lucerne and maize silage. Agricultural and Food Science. 22:137-144).

Siiski ei ole sama liigi erinevad tüved identsete omadustega, kuna esinevad geneetilistest variatsioonidest tingitud
 15 liigisisised erinevused ehk tüvespetsiifilised omadused.

Käesoleva leiutise eesmärgiks on pakkuda uus *Lactobacillus buchneri* tüvi *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 sööda fermenteerimise kvaliteedi tõstmiseks, silo aeroobse
 20 stabiilsuse ja säilimisaja pikendamiseks.

LEIUTISE OLEMUS

Leiutis käsitleb isoleeritud mikroorganismi tüve *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650, nimetatud mikroorganismi sisaldavat sööta, söödalisandit ja
 25 kompositsiooni. Söödaks võib olla fermenteeritud sööt, nt silo. Söödaks võib olla raskesti sileeritav, madala kuivainesisaldusega (≤ 20 protsenti) sööt. Söödalisandiks on näiteks silokindlustuslisand (*silage additive*). Kompositsiooni teisteks koostisosadeks võivad olla vajalikud abiained.
 30 Nimetatud mikroorganismi saab kasutada lüofiliseeritud kujul. Mikroorganismi *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 abil tagatakse sööda aeroobne stabiilsus.

Nimetatud mikroobitüve saab kasutada sööda fermenteerimiseks ja fermenteerimise parandamiseks, söödas piimhappe ja äädikhappe kontsentratsiooni suurendamiseks, pH alandamiseks ja seeläbi söödas toitainete kadude vähendamiseks.

- 5 Tuginedes antimikroobsete omaduste uuringutele, surub *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 alla mittesoovitud mikroorganismide (patogeensete mikroorganismide ning pärm- ja hallitusseente) toimet. Nimetatud enteropatogeenideks on *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*,
 10 *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar *Enteritidis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, jt.

Leiutise objektiks on ka meetod sööda säilimisaja pikendamiseks, kus fermenteerimisel lisatakse söödale mikroorganismi *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650.

- 15 Eelnimetatud tüve kasutamise korral on selle sisaldus 1×10^5 - 1×10^6 pmü/g fermenteeritava sööda kohta.

TÜVE KIRJELDUS

- Mikroobitüvi *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 isoleeriti loomulikult teel, st ilma lisanditeta käärinud
 20 kõrge kvaliteediga maisisilost (*Zea mays* L.) Eestis. Siloproovi kvantitatiivse laktobatsillaarse koostise väljaselgitamiseks tehti materjalist lahjenduste rea meetodil alaneva tiheduse astmetega suspensioon peptoonvees (Sigma-Aldrich, Prantsusmaa) ning tehti väljakülvid MRS-agarile
 25 (de Man Rogosa Sharpe'i agarile) (Biolife, Itaalia), mida inkubeeriti temperatuuril 37 kraadi mikroaeroobses keskkonnas (10 protsenti CO₂) (termostaat „MCO-18AIC UV“ Sanyo Electronic Co, Ltd, Jaapan) 48 tundi. Väljakasvanud mikroobipesad kirjeldati, loendati ja määrati mikroobide
 30 üldhulk. Mikroobide morfoloogia kirjeldamiseks tehti Grami järgi värvitud preparaadid ja mikroskopeeriti. Leiutise

objektiks olev tüvi *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 isoleeriti *Lactobacillus spp* iseloomuliku pesa- ja rakumorfoloogia alusel. Järgnes provisoorne ja seejärel täpsem identifitseerimine, mida järgnevalt kirjeldatakse.

- 5 Tüve *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 kultuur-
morfoloogilised tunnused määrati MRS-agar- ja puljongisöötmes
(Biolife, Itaalia) kasvatamise järgselt.
Lactobacillus buchneri BioCC 203 DSM 32650 on korrapärase
kujuga eosteta, liikumatu Gram-positiivne pulkbakter. Tema
10 üksikrakud asetsevad harilikult üksikult või lühikeste
ahelatena. MRS puljongis kultiveerimisel võivad esineda
pikenenud rakud.

Füsioloogilis-biokeemilised tunnused

- Mikroobitüve *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650
15 kultiveerimiseks on sobivaim MRS-puljong, milles peale 48
tundi 37 kraadi juures mikroaeroobset või anaeroobset
inkubeerimist ilmneb ühtlaselt hägune kasv. Mikroaeroobses
(10 protsenti CO₂) või anaeroobses (CO₂/N₂/H₂: 5/90/5
protsenti) keskkonnas on mikroobipesad hallikasvalged, 1,5-2
20 millimeetrit, lamedad, läikivad, poolläbipaistvad, kareda
tekstuuriga ja kõrgenenud keskosaga.

- Mikroobitüvi *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 on
obligaatselt heterofermentatiivne, katalaas- ja
oksüdaasnegatiivne, hüdrolüüsib arginiini ja produtseerib
25 glükoosi fermentatsioonil süsinikdioksiidi.

Mikroobitüve *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650
optimaalne kasvutemperatuur on 37 kraadi, paljuneb ka 15
kraadi juures, vähesel määral kasvab 45 kraadi juures. Tüve
kasvatamiseks optimaalseim pH vahemik on 5,7-6,2.

Mikroobitüvi *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 samastati kui *Lactobacillus buchneri*, kasutades MALDI Biotyper´it (Bruker Daltonik).

5 *Lactobacillus buchneri* tüvi BioCC 203 deponeeriti mikroorganismide patendiekspertiisiks deponeerimise rahvusvahelise tunnustamise Budapesti lepingu kohaselt kultuurikollektsioonis Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH 25. septembril 2017 numbri all DSM 32650.

10 Resistentsus antibiootikumidele

Metoodika: *Lactobacillus buchneri* tüve BioCC 203 DSM 32650 antibiootikumitundlikkust testiti anaeroobsetes (CO₂/N₂/H₂: 5/90/5 protsenti) tingimustes 37 kraadi juures 48 tunni jooksul vastavalt ISO10932: 2010 standardile kasutades VetMIC
15 Lact-1 ja VetMIC Lact-2 plaate (SVA Riiklik Veterinaariainstituut, Uppsala, Rootsi). Tüvede *Lactobacillus buchneri* minimaalseid inhibeerivaid kontsentratsioone (MIK) võrreldi Euroopa Toiduohutusameti (EFSA) poolt esitatud MIK-i piirväärtustega.

20 Tabel 1. *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 ja *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 poolt antibiootikumide minimaalsed inhibeerivad kontsentratsioonide (MIK) väärtused (mg/L)

Antibiootikum	<i>Lactobacillus buchneri</i> BioCC 203 DSM 32650 MIC (mg/L)	<i>Lactobacillus buchneri</i> BioCC 228 DSM 32651 MIC (mg/L)	Minimaalsed inhibeerivad kontsentratsi oonid (mg/L) *
Ampitsilliin	0,5	0,03	2
Gentamütsiin	0,5	0,5	16
Streptomütsiin	2	0,5	64
Erütromütsiin	0,06	0,016	1
Klindamütsiin	0,06	0,03	1

Tetratsükliin	8	2	8
Kloramfenikool	4	0,25	4
Kanamütsiin	2	2	32

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

5

Söödalisanditena kasutatavate mikroobide hindamiseks klassifitseeritakse tüved vastuvõtlikeks või resistentseteks antimikroobsete ainete suhtes:

10 Tundlik (S): bakteriaalne tüvi on määratletud kui vastuvõtlik, kui see on inhibeeritud spetsiifilise antimikroobse aine kontsentratsiooniga, mis on võrdne või väiksem kehtestatud piirväärtusest ($S \leq x \text{ mg / L}$).

15 Resistentne (R): bakteritüvi on määratletud kui resistentne, kui seda ei inhibeeri spetsiifilise antimikroobse aine kontsentratsioon, mis on kõrgem kui kehtestatud piirväärtus ($R > x \text{ mg / L}$).

20 Tüvede *Lactobacillus buchneri* tüvede BioCC 203 DSM 32650 ja BioCC 228 DSM 32651 antibiootikumide tundlikkuse tulemused on esitatud Tabelis 1. *Lactobacillus buchneri* tüvede BioCC 203 DSM 32650 ja BioCC 228 DSM 32651 minimaalsed inhibeerivad kontsentratsioonid ei ületanud EFSA poolt esitatud heterofermenatiivsete laktobatsillide MIK-i piirväärtusi.

25

TÜVE FUNKTSIONAALSED OMADUSED

Katse eesmärk oli uurida tüved *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 võimet kasvada erinevate suhkrute manulusel.

30 Metoodika: 24 tunni vanused MRS-agaril (Biolife, Itaalia) kasvatatud *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 ja *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 kultuurid

suspendeeriti peptoonvees McFarlandi tiheduse standardi nr 5 järgi ($1,5 \times 10^9$ mikroobi/ml), külvati lõpptihedusega 5×10^5 mikroobi/ml modifitseeritud MRS-puljongisse, mis sisaldas 20 g/L kas glükoosi, fruktoosi, trehhaloosi, ksüloosi, maltoosi või glükoosi, fruktoosi ja trehhaloosi segu vahekorras 1:1:1, suhkrute lõppkontsentratsiooniga 20g/L. Suspensioone inkubeeriti termostaadis mikroaeroobselt (10 protsenti CO₂) ja anaeroobselt (CO₂/N₂/H₂: 5/90/5 protsenti) 25 kraadi juures 24, 48 ja 72 tundi. Anaeroobse keskkonna puhul redutseeriti sööde enne katse algust 24 tunni jooksul. Katse jooksul määrati tüvede iduarv, arvutati saagis, generatsioonide arv (n) ja kasvukiirus (V) järgnevalt:

saagis = $\log N_1 - \log N_0$ kus N_1 on bakterite arv mingil ajamomendil; N_0 on bakterite arv 0 ajamomendil;

$N = \log N_1 - \log N_0 / \log 2$, kus N_1 on bakterite arv mingil ajamomendil; N_0 on bakterite arv 0 ajamomendil;

$V = \log N_1 - \log N_0 / 0,301 \times t$, kus N_1 on bakterite arv mingil ajamomendil; N_0 on bakterite arv 0 ajamomendil ja t tähistab konkreetset aega.

Tüvi *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 oli ühe generatsiooni võrra kiirema kasvuga esimese 24 tunni jooksul glükoosi, fruktoosi, ksüloosi ning glükoosi, fruktoosi ja trehhaloosi segu sisaldavas söötmes mikroaeroobsel kultiveerimisel võrreldes tüvega *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 (Tabel 2).

Tabel 2. Erinevate suhkrute mõju *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 ja *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 kasvudünaamikale mikroaeroobsel (10 protsenti CO₂) kultiveerimisel 25 kraadi juures 24, 48 ja 72 tundi

	Saagis			n			V		
	0 - 24t	24t - 48t	48 - 72t	0 - 24t	24t - 48t	48 - 72t	0 - 24t	24 - 48t	48 - 72t
203G	1,64	1,75	0,41	5,45	5,81	1,36	0,23	0,24	0,06
228G	1,43	1,53	0,3	4,76	5,08	1	0,2	0,21	0,04
203F	1,54	1,87	0,16	5,12	6,21	0,53	0,21	0,26	0,02
228F	1,24	1,76	0,02	4,12	5,85	0,07	0,17	0,24	0
203T	1,6	0,31	0,14	5,25	0,96	0,5	0,22	0,04	0,02
228T	1,58	0,29	0,15	5,32	1,03	0,47	0,22	0,04	0,02
203M	1,23	2,08	0,13	4,09	6,91	0,43	0,17	0,29	0,02
228M	0,91	1,9	0,32	3,02	6,31	1,06	0,13	0,26	0,04
203X	1,26	2,01	0,03	4,19	6,68	0,1	0,17	0,28	0
228X	1,48	1,73	0,13	4,92	5,75	0,43	0,2	0,24	0,02
203Ma	1,98	0,9	0,51	6,58	2,99	1,69	0,27	0,12	0,07
228Ma	1,92	1,01	0,43	6,38	3,36	1,43	0,27	0,14	0,06

n-generatsioonide arv; V-kasvukiirus; G-MRS-puljong glükoosiga; F-MRS-puljong fruktoosiga; T-MRS-puljong trehhaloosiga; M-MRS-puljong glükoosi-fruktoosi-trehhaloosi seguga; X-MRS-puljong ksüloosiga; Ma-MRS-puljong maltoosiga

- 5 Anaeroobsel kultiveerimisel esimese 24 tunni jooksul oli *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 keskmiselt kahe generatsiooni võrra kiirema kasvuga fruktoosi ja glükoosi, fruktoosi ja trehhaloosi segu sisaldavas söötmes ja 48 tunni jooksul kolme generatsiooni võrra kiirema kasvuga glükoosi sisaldavas söötmes ja ca 1,5 generatsiooni kiirem fruktoosi ja ksüloosi sisaldavas söötmes võrreldes tüvega *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 (Tabel 3).
- 10 *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 oli aeglasema kasvuga, suutes edestada tüve *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 peale 48 tundi kultiveerimist fruktoosi ja ksüloosi ning glükoosi, fruktoosi ja trehhaloosi segu sisaldavas söötmes.
- 15

Tabel 3. Erinevate suhkrute mõju *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 ja *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651

20

kasvudünaamikale ja anaeroobsel (CO₂/N₂/H₂: 5/90/5 protsenti) kultiveerimisel 25 kraadi juures 24, 48 ja 72 tundi

	Saagis			n			V		
	0 - 24t	24t - 48t	48 - 72t	0 - 24t	24t - 48t	48 - 72t	0 - 24t	24 - 48t	48 - 72t
203G	0,88	2,18	0,23	2,92	7,24	0,76	0,12	0,3	0,03
228G	1,11	1,26	0,78	3,69	4,19	2,59	0,15	0,17	0,11
203F	1,51	1,37	0,02	5,02	4,55	0,07	0,21	0,19	0
228F	0,82	0,96	1,08	2,72	3,19	3,59	0,11	0,13	0,15
203T	2,25	0,18	0	7,48	0,6	0	0,31	0,02	0
228T	2	0,3	0,12	6,64	1	0,4	0,28	0,04	0,02
203M	1,3	1,2	0,5	4,32	3,99	1,66	0,18	0,17	0,07
228M	0,78	1,02	1,11	2,59	3,39	3,69	0,11	0,14	0,15
203X	2,04	1,16	0	6,78	3,85	0	0,28	0,16	0
228X	1,84	0,64	0,35	6,11	2,13	1,16	0,25	0,09	0,05
203Ma	2,04	0,79	0,35	6,78	2,62	1,16	0,28	0,11	0,05
228Ma	2,05	0,78	0,2	6,81	2,59	0,66	0,28	0,11	0,03

n-generatsioonide arv; V-kasvukiirus; G-MRS-puljong glükoosiga; F-MRS-puljong fruktoosiga; T-MRS-puljong trehhaloosiga; M-MRS-puljong glükoosi-fruktoosi-trehhaloosi seguga; X-MRS-puljong ksüloosiga; Ma: MRS-puljong maltoosiga

Näide 1. Orgaaniliste hapete ja alkoholide profiil

Katse eesmärk oli määrata tüvede *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 ja *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 orgaaniliste hapete ja alkoholide profiil mikroaeroobses ja anaeroobses keskkonnas kultiveerimisel.

Metoodika: 24 tunni vanused MRS-agaril (Biolife, Itaalia) kasvatatud *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 ja *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 kultuurid suspendeeriti peptonvees McFarlandi tiheduse standardi nr 5 järgi ($1,5 \times 10^9$ mikroobi/ml), külvati MRS-puljongisse (Biolife, Itaalia) lõpptihedusega $1,5 \times 10^6$ mikroobi/ml ning inkubeeriti termostaadis mikroaeroobselt (10 protsenti CO₂)

ja anaeroobselt (CO₂/N₂/H₂: 5/90/5 protsenti) 25 kraadi juures 24, 48 ja 72 tundi.

Gaaskromatograafiliselt määrati orgaaniliste hapete ja alkoholide profiili gaaskromatograafia Agilent 6890A, 5 kasutati kapillaarkolonni CP-Wax 52 CB (30 m x 0.25 mm, 0.25 µm). Kolonni temperatuuri programm: 75 kraadi juures 1 minut, 10 kraadi /min 115 kraadi juures hoiti 3 minutit, 20 kraadi/min 190 kraadi juures hoiti 5 min, detektor (FID) 280 kraadi.

10 Vedelikkromatograafiliselt määrati orgaanilisi happeid Shimadzu Prominence HPLC System`iga, kasutati iooneraldus-kolonni. Vedelikkromatograafia Aminex HPX-87H (300 mm x 7,8 mm). Kolonni temperatuur oli 60 kraadi, voolukiirus oli 0,6 ml/min ja orgaaniliste hapete detekteerimiseks kasutati PDA- 15 detektorit lainepikkusel 210 nm. Analüüsiaeg oli 26 min.

Orgaaniliste hapete ja alkoholide profiilis ilmnesid ilmekalt tüvede *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 ja BioCC 228 DSM 32651 tüvespetsiifilised omadused (Tabel 3).

20 *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 on oluliselt tugevam etanooli, äädika ja piimhappe produtseerija nii mikroaeroobses kui anaeroobses keskkonnas kultiveerimisel. *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 on võimeline anaeroobses keskkonnas produtseerima püruvaati (Tabel 4).

25 Mikroaeroobses keskkonnas kultiveerimisel tarvitas tüvi *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 esimese 24 tunni kultiveerimise jooksul kasvukeskkonnast ära ligikaudu 99,5 protsenti ja anaeroobses keskkonnas 97,8 protsenti kasvukeskkonnas olemas olevast tsitraadist.

30 Anaeroobses keskkonnas kultiveerimisel oli *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 ära tarvitanud 4,8 protsenti kasvukeskkonnas olemas olevast tsitraadist. Erinevalt tüvest *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 oli *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 mikroaeroobses keskkonnas

kultiveerimisel suuteline 72 tunni jooksul produtseerima 5,9 protsenti tsitraati.

Tabel 4. Orgaaniliste hapete ja alkoholide profiil (mg/m) MRS puljongis *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 ja *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 mikroaeroobsel (10 protsenti CO₂) ja anaeroobsel (CO₂/N₂/H₂: 5/90/5 protsenti) kultiveerimisel 24, 48 ja 72 tunni jooksul 25 kraadi juures

	<i>Lactobacillus buchneri</i> BioCC 203 DSM 32650						<i>Lactobacillus buchneri</i> BioCC 228 DSM 32651					
	Mikroaeroobne keskkond			Anaeroobne keskkond			Mikroaeroobne keskkond			Anaeroobne keskkond		
	24 t	48 t	72 t	24 t	48 t	72 t	24 t	48 t	72 t	24 t	48 t	72 t
piimhape	2,69	8,22	8,07	2,85	8,21	8,19	0,00	0,00	7,79	2,76	4,96	2,76
äädikhape	0,63	1,25	1,29	0,61	1,38	1,25	0,47	0,62	0,54	0,01	0,28	0,33
etanool	0,59	3,91	4,02	0,58	4,69	4,36	0,03	0,03	0,09	0,00	0,00	0,00
püruvaat	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72	1,36	1,25

10

Näide 2. Orgaaniliste hapete ja alkoholide profiil maisi suprenatandis

Katse eesmärk oli määrata tüvede *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 ja *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 orgaaniliste hapete ja alkoholide profiil taimse materjali fermenteerimise käigus.

Metoodika. 226 g vegetatiivses kasvufaasis (V6-V8) maisitaimi (*Zea mays* L.) hakiti, homogeniseeriti veega laboratoorses segistis Bagmixer 400 (Interscience, Prantsusmaa) 6 minuti jooksul, filtreeriti, tsentrifuugiti toatemperatuuril 5000 rpm 10 minuti jooksul ja steriliseeriti 121 kraadi juures 5 minuti jooksul.

24 tunni vanused MRS-agaril (Biolife, Itaalia) kasvatatud *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 ja *Lactobacillus*

buchneri BioCC 228 DSM 32651 kultuurid suspendeeriti peptonvees McFarlandi tiheduse standardi nr 5 järgi ($1,5 \times 10^9$ mikroobi/ml), külvati maisitaimede supernatanti lõpptihedusega $1,5 \times 10^6$ mikroobi/ml ning inkubeeriti 5 termostaadis mikroaeroobselt (10 protsenti CO₂) 25 kraadi juures 24, 48 ja 72 tundi.

Gaaskromatograafiliselt määrati orgaaniliste hapete ja alkoholide profiil gaaskromatograafia Agilent 6890A, kasutati kapillaarkolonni CP-Wax 52 CB (30 m x 0.25 mm, 0.25 10 µm). Kolonni temperatuuri programm: 75 kraadi juures 1 minut, 10 kraadi /min 115 kraadi juures hoiti 3 minutit, 20 kraadi/min 190 kraadi juures hoiti 5 min, detektor (FID) 280 kraadi.

Vedelikkromatograafiliselt määrati orgaanilisi happeid 15 Shimadzu Prominence HPLC System'iga, kasutati iooneraldus-kolonni Vedelikkromatograafia Aminex HPX-87H (300 mm x 7,8 mm). Kolonni temperatuur oli 60 kraadi, voolukiirus oli 0,6 ml/min ja orgaaniliste hapete detekteerimiseks kasutati PDA-detektorit lainepikkusel 210 nm. Analüüsiaeg oli 26 min.

20

Tabel 5. Orgaaniliste hapete ja alkoholide profiil (mg/m) maisitaimede supernatandis *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 ja *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 mikroaeroobsel kultiveerimisel 24, 48 ja 72 tunni jooksul 25 25 kraadi juures

	<i>Lactobacillus buchneri</i> BioCC 203 DSM 32650			<i>Lactobacillus buchneri</i> BioCC 228 DSM 32651		
	24 t	48 t	72 t	24 t	48 t	72 t
piimhape	0,000	0,000	0,384	0,000	0,000	0,000
äädikhape	0,060	0,129	0,181	0,062	0,102	0,191
etanool	0,129	0,395	0,653	0,046	0,104	0,493
2,3 butaandiool	0,015	0,007	0,004	0,007	0,011	0,005

Taimse materjali fermenteerimise katses osutus *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 tugevamaks etanooli ja ka

piimhappe tootjaks võrreldes *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 (Tabel 5).

5 Näide 3. Antimikroobne aktiivsus patogeenidele

Katse eesmärk oli testida *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 ja *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 antimikroobset aktiivsust enteropatogeenide suhtes mikroaeroobses ja anaeroobses keskkonnas kultiveerimisel 25 kraadi juures.

Laktobatsilli tüvede *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 ja *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 antimikroobsete omaduste hindamiseks patogeenide vastu kasutati joonkõlvimeetodit (Hütt P, Shchepetova J, Loivukene K, Kullisaar T, Mikelsaar M. Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens. J Appl Microbiol. 2006; 100(6):1324-32).

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

25 Tabel 6. *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 ja *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 antimikroobne aktiivsus patogeenidele modifitseeritud MRS-agarsöötmeel joonkõlvi meetodil (sihtmikroobi kasvupidurdus millimeetrites) mikroaeroobses (10 protsenti CO₂) ja 30 anaeroobses (CO₂/N₂/H₂: 5/90/5 protsenti) keskkonnas

Patogeen	Kasvupidurdustsoon (mm)			
	<i>Lactobacillus buchneri</i> BioCC 203 DSM 32650		<i>Lactobacillus buchneri</i> BioCC 228 DSM 32651	
	Mikroaeroobne	Anaeroobne	Mikroaeroobne	Anaeroobne
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> WDCM 00159	16,5 ± 0,5	12,5 ± 0,8	14,3 ± 0,8	10,0 ± 0,7
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	13,8 ± 0,4	11,8 ± 0,4	14,3 ± 1,3	9,8 ± 0,8
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25932	18,8 ± 1,5	14,8 ± 1,3	16,5 ± 0,9	12,8 ± 0,4
<i>Escherichia coli</i> DSM 1576	14,5 ± 0,9	15,5 ± 1,5	15,8 ± 0,4	12,5 ± 1,1
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Enteritidis</i> ATCC 13076	14,8 ± 0,4	15,3 ± 1,3	15,5 ± 0,5	13,5 ± 0,8

Inhibitsioonitsoon mikroaeroobses keskkonnas (mm-s): nõrk <13,80; keskmine 13,79-17,11; tugev >17,12.

Inhibitsioonitsoon anaeroobses keskkonnas (mm-s): nõrk <10,67; keskmine 10,66-14,94; tugev >14,95

5

Mikroaeroobses keskkonnas omasid mõlemad tüved võrdselt tugevat antimikroobset toimet (Tabel 6). Anaeroobses keskkonnas omas *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 mõnevõrra tugevamat toimet testitud patogeene suhtes.

10

Näide 4. Antifungaalne aktiivsus

Katse eesmärk oli hinnata *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 ja *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 supernatandi toimet maisisilost isoleeritud pärmseente vastu

15 auk-difusioonimeetodil agarsöötmeil.

48 tunni vanusest laktobatsillikultuurist valmistati suspensioon peptoonvees vastavalt McFarlandi tiheduse standardile nr 5 ($1,5 \times 10^9$ mikroobi/ml), külvati MRS-puljongisse (Biolife, Itaalia) lõpptihedusega $1,5 \times 10^6$ mikroobi/ml ning inkubeeriti mikroaeroobselt (10 protsenti CO₂) ja anaeroobselt (CO₂/N₂/H₂: 5/90/5 protsenti) 25 kraadi juures 48 ja 72 tundi. Mikroobirakud eemaldati tsentrifuugimisel (4500 rpm, 10 min). Supernatant steriliseeriti filtreerimise teel ja kontsentreeriti lüofiliseerimisel. Lüofilisaat resuspendeeriti 10-kordses 10 mM äädikhappes. Kuus maisisilost isoleeritud metsikut pärmitüve külvati ühtlase kihina PCA-söötmel (Plate Count Agar; Liofilchem srl, Itaalia). Söötmesse lõigati steriilselt 6 millimeetri suurused augud, millesse lisati 100 µl steriilset supernatanti. Peale inkubeerimist 25 kraadi juures hinnati kasvupidurdustsooni laiust järgnevalt: - -toimet ei esine, + nõrk toime, pärmi kasv häiritud, ++ pärmi kasv pidurdunud, nähtav selge pidurdustsoon, +++ pärmi kasv tugevasti pidurdunud, nähtav lai selge pidurdustsoon.

20

Lactobacillus buchneri BioCC 228 DSM 32651 poolt produtseeritud antimikroobsed ühendid inhibeerivad taimset päritolu pärmseente kasvu tugevamalt võrreldes tüvega *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650. *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 tekitab juba 48 tunni jooksul pärmide kasvu tugevasti inhibeerivaid ühendeid, tekitades agarsöötmele laia selge pidurdustsooni supernatanti sisaldava augu ümber, samas kui tüve BioCC 203 supernatant vaid häiris pärmide kasvu.

30

Näide 5. Kasvudünaamika taimse materjali fermenteerimise käigus

Katse eesmärk oli uurida tüvede *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 ja *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 kasvudünaamikat taimse materjali fermenteerimise käigus.

5 Metoodika. 226 g vegetatiivses kasvufaasis (V6-V8) maisitaimi (*Zea mays* L.) hakiti, homogeniseeriti veega laboratoorses segistis Bagmixer 400 (Interscience, Prantsusmaa) 6 minuti jooksul, filtreeriti, tsentrifuugiti toatemperatuuril 5000 rpm 10 minuti jooksul ja steriliseeriti 121 kraadi juures 5
10 minuti jooksul.

24 tunni vanused MRS-agaril (Biolife, Itaalia) kasvatatud *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 ja *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 kultuurid suspendeeriti peptoonvees McFarlandi tiheduse standardi nr 5 järgi ($1,5 \times 10^9$ mikroobi/ml), külvati maisitaimede supernatanti lõpptihedusega $1,5 \times 10^6$ mikroobi/ml ning inkubeeriti termostaadis mikroaeroobselt (10 protsenti CO₂) 25 kraadi juures 24, 48 ja 72 tundi.

Katse jooksul määrati tüvede iduarv ning arvutati saagis, generatsioonide arv (n) ja kasvukiirus (V) järgnevalt:

saagis = $\log N_1 - \log N_0$, kus N_1 on bakterite arv mingil ajamomendil; N_0 on bakterite arv 0 ajamomendil;

$N = \log N_1 - \log N_0 / \log 2$, kus N_1 on bakterite arv mingil ajamomendil; N_0 on bakterite arv 0 ajamomendil;

25 $V = \log N_1 - \log N_0 / 0,301 \times t$, kus N_1 on bakterite arv mingil ajamomendil; N_0 on bakterite arv 0 ajamomendil ja t tähistab konkreetset aega.

30 Tabel 7. *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 ja *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 kasvudünaamika mikroaeroobsel (10protsenti CO₂) kultiveerimisel 25 kraadi juures 24, 48 ja 72 tundi

	Saagis			n			V		
	0- 24t	24t- 48t	48- 72t	0- 24t	24t- 48t	48- 72t	0- 24t	24- 48t	48- 72t
203	2	1	1,04	6,6	3,3	3,5	0,28	0,14	0,14
228	0,74	0,26	1,17	2,5	0,9	3,9	0,10	0,04	0,16

n-generatsioonide arv; V-kasvukiirus

Maisi supernatandis mikroaeroobses keskkonnas kultiveerimisel oli tüvi *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 nelja
 5 generatsiooni võrra kiirema kasvuga esimese 24 tunni jooksul ja 2,4 generatsiooni võrra kiirem 48 tunni jooksul võrreldes tüvega *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 (Tabel 7).

10 Näide 6. Silokindlustuslisandite *L. buchneri* BioCC 203 DSM 32650 ja *L. buchneri* BioCC 228 DSM 32651 toime uurimine kergesti sileeritaval taimsel materjalil

Katse eesmärk oli hinnata silokindlustuslisandite *L. buchneri*
 15 BioCC 203 DSM 32650 ja *L. buchneri* BioCC 228 DSM 32651 toimet maisist (*Zea mays*, maisisort „Cathy“) valmistatud silo (kuivaine sisaldus \geq 30 protsenti) fermentatsiooni kvaliteedile ja aeroobsele stabiilsusele.

Katse viidi läbi 1,5 liitristes laboratoorsetes silomahutites
 20 hekseldatud vahaküpsuses haljasmaisiga.

Viidi läbi järgmised uuringud: pH-taseme ja fermentatsiooni kvaliteedi määramine 90 päeval. Tehti kaks aeroobse stabiilsuse katset. Esimene katse tehti pärast 49-päevast säilitusaega kahe aeroobse stressiga (24 tunni järel, 28.
 25 päeval ja 42. päeval). Aeroobse stabiilsuse katse viidi läbi kontrollitud temperatuuriga ruumis ligikaudu 20 kraadi

juures. Temperatuurid fikseeriti iga 4 tunni järel seadmetega PS-ES Datalogging system.

Algmaterjali keemiline koostis on esitatud tabelis 8.

5 Tabel 8. Algmaterjali keemiline koostis

Näitaja	Maisisort "Cathy" 09.10.2017
Kuivaine (DM), g/kg	339
Toortuhk, g/kg DM	30
Toorproteiin g/kg DM	71
Toorrasv, g/kg DM	25
Toorkiud, g/kg DM	181
Toortärklis, g/kg DM	328
Vees lahustuvad süsivesikud (WSC), g/kg DM	87
Nitraat, mg/kg DM	587
Puhverdusvõime (BC), g piimhape/kg DM	23
Fermentatsiooni koefitsient *	64

* DM protsent + (8x(WSC/BC))

10 *L. buchneri* BioCC 203 DSM 32650 ja *L. buchneri* BioCC 228 DSM 32651 lisamine põhjustas äädikhappe ja 1,2-propaandiooli olulise tõusu võrreldes kontrollsiloga (tabel 9).

15 Tabel 9. Maisisordist „Cathy“ mikroorganismide *L. buchneri* BioCC 203 DSM 32650 ja *L. buchneri* BioCC 228 DSM 32651 abil valmistatud silode keemilise koostise, toiteväärtuse ning fermentatsiooni kvaliteedi näitajad peale 90-päevast säilitamist

Näitaja	Kontroll	<i>L. buchneri</i> BioCC 203 DSM 32650	<i>L. buchneri</i> BioCC 228 DSM 32651
Kuivaine, %	34,6	34,5	35,5
Toorproteiin, %	6,9	7,0	7,1
Toortuhk, %	3,2	3,3	3,4
Toorkiud, %	20,1	20,9	20,7
Toortärklis, %	31,5	29,8	30,4
Etanool, g/kg	10	10	10
Äädikhape, g/kg	12	19	19

Propioonhape, g/kg	n.d.	n.d.	n.d.
Palderjanhape, g/kg			
Näitaja	Kontroll	<i>L. buchneri</i> BioCC 203 DSM 32650	<i>L. buchneri</i> BioCC 228 DSM 32651
Piimhape, g/kg	79	67	65
1,2-propaandiool, g/kg	1	7	7
pH	3,7	3,8	3,8
Ammoniaak-N üld N- st, %	7,7	7,7	8,1

n.d.- ei määratud

- Pärast 49-päevast säilitamisperioodi läbi viidud aeroobse stabiilsuse testis olid *L. buchneri* BioCC 203 DSM 32650 ja *L. buchneri* BioCC 228 DSM 32651 abil valmistatud silod kontrollsiloga võrreldes oluliselt stabiilsemad (ligikaudu 2 kuni 2,5 päeva võrra), kontroll: 3,9 päeva vs *L. buchneri* BioCC 203 DSM 32650: 6,3 päeva ja *L. buchneri* BioCC 228 DSM 32651: 5,8 päeva.
- 10 Säilitamisaja pikendamisel 90 päevani suurenes aeroobne stabiilsus kontrollsilol 7,9 päeva, *L. buchneri* BioCC 203 DSM 32650 abil valmistatud silos 10,6 päeva ja 11,4 päeva *L. buchneri* BioCC 228 DSM 32651 abil valmistatud silos. Erinevus *L. buchneri* BioCC 203 DSM 32650 puhul alla kolme päeva ja *L. buchneri* BioCC 228 DSM 32651 puhul üle kolme päeva oli statistiliselt oluline.

Näide 7. Silokindlustuslisandite *L. buchneri* BioCC 203 DSM 32650 ja *L. buchneri* BioCC 228 DSM 32651 toime uurimine raskesti sileeritavale materjalile

Katse eesmärk oli hinnata isoleeritud tervikkoristatud madala kuivainesisaldusega (≤ 20 protsenti) maisist (*Zea mays*, maisisort 'Dorka') mikroorganismi tüvede *L. buchneri* BioCC 203 DSM 32650 ja *L. buchneri* BioCC 228 DSM 32651 abil

valmistatud silo fermentatsiooni kvaliteeti ja aeroobset stabiilsust.

Tüvesid *L. buchneri* BioCC 203 DSM 32650 ja *L. buchneri* BioCC
5 228 DSM 32651 lisati sileeritavale materjalile vesilahusena
kontsentratsioonis 1×10^5 pmü/g sileeritava taimse materjali
(sööda) kohta. Kõik katsevariandid (kontrollsilod,
piimhappebakteri tüvedega *L. buchneri* BioCC 203 DSM 32650 ja
L. buchneri BioCC 228 DSM 32651 valmistatud silod ja
10 silokindlustuslisandita valmistatud kontrollsilod) valmistati
viies korduses. Katsesilod avati peale 90 päevast
sileerimist.

Algmaterjali keemiline koostis on esitatud tabelis 10.

Silo aeroobse stabiilsuse katse viidi läbi peale 90 päevast
15 säilitamist Honig'i poolt kirjeldatud meetodil (Honig, H.,
1990: Evaluation of the aerobic stability. In: Proceedings of
the Eurobac Conference, Swedish University of Agricultural
Sciences, Uppsala/Sweden, Special Issue). Silo loeti
aeroobselt ebastabiilseks, kui selle geomeetrisest
20 keskpunktist mõõdetud temperatuur ületas 3 kraadi võrra
ambientset temperatuuri. Temperatuuri muutuseid ajas mõõdeti
9 päeva (216 tunni) vältel. Ruumi (ambientse temperatuuri) ja
katsesilode temperatuurid fikseeriti iga tunni aja tagant
seadmetega Comet Temperature Data Logger S0141.

25 Siloproove analüüsiti üldtunnustatud metoodikate 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
30 130 kraadi juures konstantse kaaluni. Toortuha sisalduse
leidmiseks põletati siloproovi kuus tundi muhvelahjus
temperatuuril 550 kraadi. Proteiinisaldus määrati
analüsaatoriga Kjeltex™ 2300 Kjeldhali meetodil (Nx6,25).
Toorkiud määrati W. Hennebergi ja F. Stohmanni metoodika

järgi. Silos sisalduvate hapete ja etanooli sisalduse määramiseks kasutati gaaskromatograafi Agilent 7890A. Ammoniaaklämmastiku sisaldus üldlämmastikust määrati analüsaatoriga Kjeltect™ 2300. Silo happesus määrati pH-meetriga Hanna Instruments HI 2210.

Tabel 10. Algmaterjali keemiline koostis

Näitaja	Maisisort 'Dorka' 20.10.2017
Kuivaine, %	19,5
Kuivaines:	
Toorproteiin, %	9,0
Toortuhk, %	4,9
Toorkiud, %	22,3
Toorrasv, %	2,1
Lämmastikuta ekstraktiivained, %	61,7
Kaltsium, g/kg	3,3
Fosfor, g/kg	3,4

Kõikide silode kuivainesisaldus oli $\leq 18\%$ (Tabel 11). Siiski olid maisisordist 'Dorka' ja *L. buchneri* tüvega BioCC 203 DSM 32650 või *L. buchneri* tüvega BioCC 228 DSM 32651 valmistatud silod heade fermentatsiooninäitajatega (Tabel 11). Piimhape oli domineeriv hape kõikides silodes. *L. buchneri* tüvega BioCC 203 DSM 32650 valmistatud silodes oli kõrgem äädikhappe ja 1,2-propaandiooli kontsentratsioon võrreldes *L. buchneri* tüvega BioCC 228 DSM 32651 valmistatud silo ja kontrollsiloga. Etanooli sisaldus kõikides silodes oli madal (4.1 kuni 8.6 g / kg).

Tabel 11. Maisisordist 'Dorka' mikroorganismide *L. buchneri* BioCC 203 DSM 32650 ja *L. buchneri* BioCC 228 DSM 32651 abil valmistatud silode keemilise koostise, toiteväärtuse ning

fermentatsiooni kvaliteedi näitajad peale 90-päevast säilitamist

Näitaja	Kontroll	<i>L. buchneri</i> BioCC 203 DSM 32650	<i>L. buchneri</i> BioCC 228 DSM 32651
Kuivaine, %	18,0	17,8	17,8
Kuivaines:			
toorproteiin, %	9,6	9,7	9,5
toortuhk, %	5,3	5,5	5,6
toorkiud, %	23,9	24,3	24,4
toorrasv, %	2,7	2,7	2,7
lämmastikuta ekstraktiivained, %	58,5	57,9	57,8
kaltsium, g/kg	4,1	4,1	4,3
fosfor, g/kg	3,6	3,7	3,7
Metaboliseeruv energia, MJ/kg	10,3	10,3	10,3
Metaboliseeruv proteiin, g/kg	76	76	76
Vatsa proteiini bilanss, g/kg	-33	-32	-34
Orgaanilise aine seeduvus, %	68	68	68
Etanool, g/kg	5,7	4,1	4,6
Äädikhape, g/kg	33,3	44,3	41,2
Propioonhape, g/kg	0,1	0,1	0,1
Palderjanhape, g/kg	0,0	0,0	0,0
Võihape, g/kg	0,0	0,0	0,0
Piimhape, g/kg	85,5	83,0	84,8
Kokku happeid	118,8	127,3	126,1
1,2-propaandiool, g/kg	5,4	20,5	16,7
2,3-butaandiool, g/kg	1,5	1,4	1,5
pH	3,6	3,6	3,6
Ammoniaak-N üld N-st, %	4,7	4,7	4,7
Aeroobne stabiilsus, h	149	217	217

Sileeritava materjali ja maisisilo fermentatsiooni kvaliteedi mikrobioloogilised näitajad on esitatud tabelis 12.

- 5 Hallituste hulgas olid sileeritavas materjalis suhteliselt kõrged, klostriidide ja pärmide tase oli alla määrmispiiri.

Tüvega *L. buchneri* BioCC 203 DSM 32650 või *L. buchneri* BioCC 228 DSM 32651 valmistatud siloproovid sisaldasid väga suurtes hulkades piimhappebaktereid ($>8,0 \log_{10}$ pmü/g silos) ja siloproovides domineerisid lisatud tüved endogeensete piimhappebakterite üle. Piimhappebakterite hulk kontrollsilos oli $4.56 \log_{10}$ pmü/g silos.

Tabel 12. Fermentatsiooni kvaliteedi mikrobioloogilised näitajad algmaterjalis ja *L. buchneri* BioCC 203 DSM 32650 või *L. buchneri* BioCC 228 DSM 32651 abil maisisordist Dorka valmistatud siloproovides

Näitaja	Algmaterjal		Kontroll		<i>L. buchneri</i> BioCC 203 DSM 32650		<i>L. buchne-ri</i> BioCC 228 DSM 32651	
	Keskmine, \log_{10}	SD	Keskmine, \log_{10}	SD	Keskmine, \log_{10}	SD	Keskmine, \log_{10}	SD
Piimhappebakterid	3,80	0,32	4,56	0,62	8,3	0,03	8,25	0,55
Pärmid	<2*	**	<2*	**	<2	**	<2*	**
Hallitused	5,78	0,7	<2*	**	<2*	**	<2*	**
<i>Clostridium</i> spp.	<4	**	<2*	**	<2*	**	<2*	**

*- allpool määramispiiri

** - ei ole arvatav

Silo aeroobse stabiilsuse katses läks kontrollsilodest kuumaks neli silo viiest. Keskmiseks aeroobseks stabiilsuseks kujunes 149 tundi (s.t 6,2 päeva). Tüvedega *L. buchneri* BioCC 203 DSM 32650 ja *L. buchneri* BioCC 228 DSM 32651 valmistatud silod olid aeroobselt stabiilsed katse lõpuni, s.t 217 h (s.t 9,04 päeva). Seega algmaterjalist tüvedega *L. buchneri* BioCC 203 DSM 32650 ja *L. buchneri* BioCC 228 DSM 32651 valmistatud silo aeroobne stabiilsus pikenes 2,84 päeva võrra.

Kokkuvõtteks. Tüved *L. buchneri* BioCC 203 DSM 32650 ja *L. buchneri* BioCC 228 DSM 32651 osutusid raskesti sileeritavast materjalist valmistatud silos väga jõulise kasvuga juuretisteks. *L. buchneri* BioCC 203 DSM 32650 ja *L. buchneri* BioCC 228 DSM 32651 kasutamine suurendas madala kuivaine sisaldusega (≤ 20 protsenti) silos piimhappesisaldust, inaktiveeris mikroobide ja pärmide aktiivsust, kaitstes silo kuumenemise eest ja seeläbi parandades silo aeroobset stabiilsust pärast silo avamist, pikendades silo säilitusaega.

PATENDINÕUDLUS

1. Isoleeritud mikroorganismi tüvi *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650.
- 5 2. Mikroorganism vastavalt punktile 1 lüofiliseeritud kujul.
3. Kompositsioon, mis sisaldab punktidele 1 või 2 vastavat mikroorganismi.
4. Mistahes punktile 1-2 vastavat mikroorganismi tüve
10 sisaldav sööt.
5. Sööt vastavalt punktile 4, milleks on fermenteeritud sööt, nt silo.
6. Mistahes punktile 1-2 vastava mikroorganismi kasutamine söödalisandina.
- 15 7. Mistahes punktile 1-2 vastava mikroorganismi kasutamine silo aeroobse stabiilsuse tagamiseks.
8. Mikroorganismi kasutamine vastavalt punktile 7, kusjuures silo on valmistatud madala kuivaine sisaldusega (≤ 20 protsenti) söödast.
- 20 9. Mistahes punktile 1-2 vastava mikroorganismi kasutamine sööda fermenteerimiseks.
10. Üht või mitut mistahes punktidele 1-2 vastavat mikroorganismi sisaldav kompositsioon kasutamiseks sööda fermenteerimise parandamiseks, söödas piimhappe ja äädikhappe kontsentratsiooni suurendamiseks, pH alandamiseks ja seeläbi söödas toitainetekadude vähendamiseks.
- 25 11. Mistahes punktile 1-2 vastava mikroorganismi kasutamine sööda fermenteerimisel patogeensete mikroobide toime allasurumisel ja pärmseente kasvu pidurdamiseks, mis seisneb mistahes punktile 1-2 vastava mikroorganismi lisamises fermenteeritavale söödale.
- 30

12. Mikroorganismi kasutamine vastavalt punktile 11, kus patogeenseteks mikroobideks on enteropatogeenid.
 13. Meetod sööda säilimisaja pikendamiseks, kus söödale lisatakse enne fermenteerimist mistahes punktile 1-2 vastavat mikroorganismi.
- 5