

**(12) PATENDIKIRJELDUS**

(21) Patenditaotluse number:	<b>P202100004</b>	(73) Patendiomanik:
(22) Patenditaotluse esitamise kuupäev:	<b>27.09.2018</b>	<b>BioCC OÜ</b> <b>Kreutzwaldi 1, 51014 Tartu, EE</b>
(62) Varasema patenditaotluse, millest patenditaotlus on eraldatud, esitamise kuupäev ja number:	<b>27.09.2018</b> <b>P201800024</b>	(72) Leiutise autorid:
(24) Patendi kehtivuse alguse kuupäev:	<b>27.09.2018</b>	<b>Epp Songisepp</b> <b>Tähe 105-7, 50107 Tartu, EE</b>
(43) Patenditaotluse avaldamise kuupäev:	<b>15.03.2021</b>	<b>Oksana Gerulis</b> <b>Veibri küla, Luunja vald,</b> <b>62220 Tartu maakond, EE</b>
(45) Patendikirjelduse avaldamise kuupäev:	<b>17.05.2021</b>	<b>Liina Kuus</b> <b>Silmapiiri põik 3-2, Ülenurme alevik,</b> <b>Kambja vald, 61714 Tartu maakond, EE</b>
(83) Bioloogilise aine, sh mikroorganismi tüve deponeerimise andmed:	<b>DSM 32651, 25.09.2017, DSMZ</b>	<b>Sirje Kuusik</b> <b>Mõisavahe 24-3, 50707 Tartu, EE</b>
		<b>Merle Muruvee</b> <b>Tähe 83-6, 50107 Tartu, EE</b>
		<b>Anette Sibrits</b> <b>Lehise tee 19-2, Haaslava küla, Kastre vald,</b> <b>62107 Tartu maakond, EE</b>
		<b>Meelis Ots</b> <b>Nõva 13-15, 50106 Tartu, EE</b>
		<b>Andres Olt</b> <b>Muru 8-9, 50303 Tartu, EE</b>
(74) Patendivolinik:		<b>Sirje Kahu</b> <b>Patendibüroo Usterval OÜ</b> <b>Kivi 21-6, 51009 Tartu, EE</b>

(54) Mikroorganismi tüvi *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 ja selle kasutamine

(57) Leiutis käsiteb isoleeritud mikroorganismi tüve *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 ja selle kasutamist söödalislindina. Tüve kasutatakse raskesti sileeritava, madala kuivaine sisaldusega ( $\leq 20$  protsent) sööda aeroobse stabiilsuse tagamiseks, fermenteerimise parandamiseks, söödas piimhappe ja äälikhappe kontsentratsiooni suurendamiseks, pH alandamiseks ja seeläbi söödas toitainete kadude vähendamiseks. Mikroorganism surub söödas alla patogeensete mikroorganismide ning pärmi ja hallitusseente toimet. Tüvede abil saab pikendada raskesti sileeritavast materjalist valmistasid sööda sälimisaega.

(57) The invention provides the isolated microorganism strain *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 and its use as microbiological feed additive. The strain is used for ensuring aerobic stability of feed with low dry matter content ( $\leq 20$  percentage) and improving fermentation of feed, for increasing the concentration of lactic and acetic acids 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 228 DSM  
32651 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 töstmiseks.

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) stabiilne 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, enteropatogeenide, listeeriate, batsillide) ja seente (pärm- ja hallitusseened) 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 paljud taime ensüümid sileerimisprotsessil aktiivsed ning neis tingimustes suudavad silos kasvada hulgaliselt 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 toimub veeslahustuvate süsivesikute fermenteerimine piimhappeks piimhappebakterite poolt. Selle tulemusena sileeritava materjali pH langeb (sileeritav mass hapestub) ning see omakorda surub maha riknemist põhjustavate mikroorganismide elutegevuse (Oude 25 Elferink, S. 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 happenus pH 4 juurde, seda kiiremini ensümaatiline ja 30 mikrobiaalne aktiivsus lakkab, sööt muutub stabiilseks ja rohkem toitaineid säilitatakse.

Juba varasemalt 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. 5 Chalcombe Publications, Marlow, Bucks UK, p. 340).

Sama tähtis, kui toitainete säilitamine silo fermentatsiooni ja hoiustamise faasis, on oluline säilitada silo toitained hoidla avamisel. Silo võib olla eksponeeritud hapnikule nii söötmise eesmärgil silohoidla avamisel kui ka hoidla 10 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 15 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 20 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- 25 Richtlinien für die Prüfung von Siliermitteln auf DLG-Gütezeichen-Fähigkeit Oktober 2013), seda aeroobsett stabiilsem ja parem on silo. Enamik es aeroobsett riknevates silodes tõuseb temperatuur üle ambientse temperatuuri hapete ja veeslahustuvate süsivesikute mikrobiaalsel oksüdatsioonil 30 süsihappaasiks 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 pärmeentest, kes saavad kasvada ka üsna madala pH juures. Pärmid on suutelised kasvama laias pH vahemikus (pH 3-8). 5 Optimaalne pH enamike pärmitide kasvuks on 3,5-6,5. Kui silo puutub hoidla avamisel kokku õhuga, siis fermentatsioonil tekkinud happed jt ühendid oksüdeeritakse aeroobsete bakterite, pärmitide ja hallituste poolt. Pärmide elutegevuse tulemusena tekib süsinikdioksiid ning see põhjustab silo 10 kuumenemist, mis omakorda on otsestelt 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 energia allikana silos elevat 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 20 tekib võimalus aktiveeruda mitmetel teistel aeroobsetel mikroorganismidel ja hallitusseentel. Hästi fermenteerunud toitaineterikka 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 pärmitide osas näitas, et suurem kontsentratsioon põhjustas õhuga kokku puutumisel silo temperatuuri kiirema tõusu. Seevastu äädik- ja võihappe näitasid, et nende

fermentatsiooniproduktide suuremat kontsentratsiooni seostati stabiilsema siloga.

Nagu mainitud, silo madalal pH väärtsusel aeroobset riknemist põhjustavatele mikroorganismidele otsest mõju ei ole, kuid erinev tähtsus on silo fermentatsioonil tekkinud hapetel. Pärmide kasvu inhibeerivad dissotseerumata lühikesed 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 vastuvõtlikus aeroobsele riknemisele. Seevastu äädik- ja propioonhape on efektiivsed pärm- ja hallitusseente inhibeerijad. Võihappel on sarnane mõju. Võihappeline silo on aeroobselt stabiilne, kuid see viitab riknemist põhjustavate klostriidide aktiivsusele. Sellisel silol on suured toitainete kaod ja kõrge võihappesisaldus võib loomadel põhjustada terviseprobleeme. Propioonhapet esineb silos harva ja väikestes kogustes ning seda produktseerivate mikroorganismide kontsentratsioon silokultuuridel on väike ja nende konkurentsivõime on madal.

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

Ideaalne silo fermentatsioon vähendab fermentatsiooni kadusid 5 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 10 sileerimise protsessi ja sileeritud sööda toiteväärtsuse 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 15 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 20 need ei inhibeeri pärme ja hallitusi, mistöttu ensüümidega valmistatud silodel on väga tagasihoidlik aeroobne stabiilsus.

Silo aeroobse stabiilsuse parandamisel on efektiivsed orgaanilised happed, nagu propioon-, äädik- ja bensoehape jt. 25 Neid lisatakse kas suures koguses, et saavutada sööda nn lõplik konserveerimine, või väiksemas koguses. Viimasel juhul küll surutakse maha pärnseente aktiivsus, kuid ei tagata täielikku konserveerimist ja sileerimine sõltub jätkuvalt looduslikust fermentatsioonist. Samuti on leitud ammoniaagi 30 pärssiv mõju aeroobsetele bakteritele ning pärn- 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 ei ole toksilised, ei korrodeerivad seadmeid ja ei põhjusta keskkonna riske.

- 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 käärkimisprotsessi alguses domineerivad homofermentatiivsed liigid, kuid hiljem keskkonna 15 happelemaks 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 bakterjuuretisi inhibeerivad vähe pärmitide ja hallituste kasvu. 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 produktseerivad lisaks piimhappele suures koguses ka äädikhapet (*L. buchneri*), pärsvivad silo aeroobset riknemist põhjustavaid mikroorganisme (pärmi- 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 tähetatud tugevat inhibeerivat toimet pärmitide 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 sama liigi erinevad tüved ei ole identsete omadustega, kuna esinevad geneetilistest variatsioonidest tingitud 15 liigisisesed erinevused ehk tüvespetsiifilised omadused.

Käesoleva leiutise eesmärgiks on pakkuda uus *Lactobacillus buchneri* tüvi

*Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 sööda 20 fermenteerimise kvaliteedi tõstmiseks, silo aeroobse stabiilsuse ja säilitmisaja pikendamiseks.

#### LEIUTISE OLEMUS

Leiutis käsitleb isoleeritud mikroorganismi tüve *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651, eelnimetatud 25 mikroorganismi sisaldavat sööta, söödalisaandit ja kompositsiooni. Söödaks võib olla fermenteeritud sööt, nt silo. Söödalisaandiks on näiteks silokindlustuslisand (*silage additive*). Kompositsiooni teisteks koostisosadeks võivad olla vajalikud abiained. Nimetatud mikroorganismi saab kasutada 30 lüofiliseeritud kujul.

Mikroorganismi *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 abil tagatakse sööda aeroobne stabiilsus.

Nimetatud mikroobitüve kasutatakse 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 228 DSM 32651 alla mittesoovitud mikroorganismide (patogeensete mikroorganismide ning pärn- 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 228 DSM 32651.

- 15 Nimetatud tüve kasutamise korral on selle sisaldus  $1 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  pmü/g fermenteeritava sööda kohta.

#### TÜVE KIRJELDUS

- Mikroobitüvi *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 isoleeriti loomulikul 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 peptooneves (Sigma-Aldrich, Prantsusmaa) ning teostati väljakülvid MRS (de Man 25 Rogosa Sharpe) agarile (Biolife, Itaalia), mida inkubeeriti temperatuuril 37 kraadi mikroaeroobses keskkonnas (10 protsendi CO<sub>2</sub>) (termostaat „MCO-18AIC UV“ Sanyo Electronic Co, Ltd, Jaapan) 48 tundi. Väljakasvanud mikroobipesad kirjeldati, loendati ja määratati mikroobide üldhulk.
- 30 Mikroobide morfoloogia kirjeldamiseks tehti Grami järgi värvitud preparaadid ja mikroskopeeriti. Leiutise objektiks

olev tüvi *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 isoleeriti *Lactobacillus spp* iseloomuliku pesa- ja rakumorfoloogia alusel. Järgnes provisoorne ja seejärel täpsem identifikatsioon, mida järgnevalt kirjeldatakse.

5 Tüve *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 kultuur- morfoloogilised tunnused määratati MRS agar ja puljongsöötmes (Biolife, Itaalia) kasvatamise järgselt.

10 *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 on korrapärase kujuga eosteta, liikumatu Gram-positiivne pulkbakter. Tema üksikrakud asetsevad harilikult üksikult või lühikeset ahelatena. MRS puljongis kultiveerimisel võivad esineda pikenenud saledad rakud.

#### **Füsioloogilis-biokeemilised tunnused**

15 Mikroobitüve *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 kultiveerimiseks on sobivaim MRS puljong, milles peale 48 tundi 37 kraadi juures mikroaeroobset või anaeroobset inkubeerimist ilmneb ühtlaselt hägune kasv. Mikroaeroobses (10 protsendi CO<sub>2</sub>) või anaeroobses (CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>: 5/90/5 protsendi) keskkonnas on 48 tunni vanused mikroobiopesad 20 hallikasvalged, 1,5-2 millimeetrit, lamedad, läikivad, poolläbipaistvad, kareda tekstuuriga ja kõrgenenud keskosaga.

Mikroobitüve *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 optimaalne kasvutemperatuur on 37 kraadi, paljuneb ka 15 kraadi juures. Vähesel määral kasvab 45 kraadi juures. Tüve 25 kasvatamiseks optimaalseim pH vahemik on 5,7-6,2.

Mikroobitüvi *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 on obligaatselt heterofermentatiivne, katalaas- ja oksüdaasnegaatiivne, hüdrolüüsib arginiini ja produtseerib glükoosi fermentatsioonil süsinikdioksiidi.

Mikroobitüvi *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 samastati kui *Lactobacillus buchneri* kasutades MALDI Biotyper-it (Bruker Daltonik).

*Lactobacillus buchneri* tüvi BioCC 228 deponeeriti 5 mikroorganismide patendiekspertiisiks deponeerimise rahvusvahelise tunnustamise Budapesti lepingu kohaselt kultuurikollektsioonis Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH 25. septembril 2017 numbri all DSM 32651.

#### 10 Resistentsus antibiootikumidele

Metoodika: *Lactobacillus buchneri* tüve BioCC 228 DSM 32651 antibiootikumitundlikkust testiti anaeroobsetes ( $\text{CO}_2/\text{N}_2/\text{H}_2$ : 5/90/5 protsent) tingimustes 37 kraadi juures 48 tunni jooksul vastavalt ISO10932: 2010 standardile kasutades VetMIC

15 Lact-1 ja VetMIC Lact-2 plaate (SVA Riiklik Veterinaariainstiitut, Uppsala, Rootsi). Tüvede *Lactobacillus buchneri* Minimaalseid inhibeerivaid kontsentratsioone (MIK) võrreldi Euroopa Toiduohutusameti (EFSA) poolt esitatud MIK-i piirväärustega.

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 Söödalisaanditena kasutatavate mikroobide hindamiseks tüved klassifitseeritakse vastuvõtlikeks või resistensteteks antimikroobsete ainete suhtes:

Tundlik (S): bakteriaalne tüvi on määratletud kui vastuvõtlik, kui see on inhibeeritud spetsiifilise

10 antimikroobse aine kontsentratsiooniga, mis on võrdne või väiksem kehtestatud piirväärtusest ( $S \leq x \text{ mg / L}$ ).

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

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 20 DSM 32650 ja BioCC 228 DSM 32651 minimaalsed inhibeerivad kontsentratsioonid ei ületanud EFSA poolt esitatud heterofermentatiivsete laktobatsillide MIK-i piirväärtusi.

## 25 TÜVEDE FUNKTIONAALSED OMADUSED

Katse eesmärk oli uurida tüve *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 võimet kasvada erinevate suhkrute manuluse sel.

Metoodika: 24 tunni vanused MRS (Biolife, Itaalia) agaril 30 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 lõppnihedusega  $5 \times 10^5$  mikroobi/ml modifitseeritud MRS puljongisse, mis sisaldas 20 g/L kas glükoosi, fruktoosi, trehhaloosi, ksüloosi, maltoosi 5 või glükoosi, fruktoosi ja trehhaloosi segu vahekorrask 1:1:1, suhkrute lõppkontsentratsioonga 20g/L. Suspenisoone inkubeeriti termostaadis mikroaeroobselt (10 protsentti  $\text{CO}_2$ ) ja anaeroobselt ( $\text{CO}_2/\text{N}_2/\text{H}_2$ : 5/90/5 protsentti) 25 kraadi juures 10 24, 48 ja 72tundi. Anaeroobse keskkonna puhul redutseeriti sööde enne katse algust 24 tunni jooksul. Katse jooksul määrati tüvede iduarv, arvutati saagis, generatsionide arv 15 (n) ja kasvukiirus (V) järgnevalt:

Saagis =  $\log N_t - \log N_0$  us  $N_t$  on bakterite arv mingil ajamomendil;  $N_0$  on bakterite arv 0 ajamomendil  
 n=  $\log N_t - \log N_0 / \log 2$ , kus  $N_t$  on bakterite arv mingil ajamomendil;  $N_0$  on bakterite arv 0 ajamomendil  
 $V = \log N_t - \log N_0 / 0,301 \times t$ , kus uss  $N_t$  on bakterite arv mingil ajamomendil;  $N_0$  on bakterite arv 0 ajamomendil ja t 20 tähistab konkreetset aega.

Tüvi *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 oli ühe generatsiooni vörra kiirema kasvuga esimese 24 tunni jookul 25 glükoosi, fruktoosi, ksüloosi ning glükoosi, fruktoosi ja trehhaloosi segu sisaldavas söötmes mikroaeroobsel kultiveerimisel vörreldes tüvega *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 (Tabel 2).

30 Tabel 2. Erinevate suhkrute mõju *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 ja *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 kasvudünaamikale mikroaeroobsel (10 protsentti  $\text{CO}_2$ ) kultiveerimisel 25 kraadi juures 24, 48 ja 72 tundi.

	Saagis			n			V		
	0 - 24t 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 sialdavas söötmes vörreledes 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

kasvudünaamikale ja anaeroobsel ( $\text{CO}_2/\text{N}_2/\text{H}_2$ : 5/90/5 protsent) kultiveerimisel 25 kraadi juures 24, 48 ja 72tundi.

	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
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

5 trehhaloosiga; M-MRS puljong glükoosi-fruktoosi-trehhalooosi seguga; X-MRS puljong ksüloosiga; Ma: MRS puljong maltoosiga

#### Näide 1. Orgaaniliste hapete ja alkoholide profiil

Katse eesmärk oli määrata tüvede *Lactobacillus buchneri* BioCC

10 203 DSM 32650 ja *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 orgaaniliste hapete ja alkoholide profiili mikroaeroobses ja anaeroobses keskkonnas kultiveerimisel.

Metoodika: 24 tunni vanused MRS (Biolife, Itaalia) agaril

15 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 (Biolife, Itaalia) puljongisse lõpptihedusega  $1,5 \times 10^6$  mikroobi/ml ning 20 inkubeeriti termostaadis mikroaeroobselt (10 protsendi  $\text{CO}_2$ )

ja anaeroobselt ( $\text{CO}_2/\text{N}_2/\text{H}_2$ : 5/90/5 protsent) 25 kraadi juures 24, 48 ja 72tundi.

- Gaaskromatograafiliselt määrati orgaaniliste hapete ja alkoholide profiili gaaskromatograafiga Agilent 6890A, 5 kasutati kapillaarkolonni CP-Wax 52 CB (30 m x 0.25 mm, 0.25  $\mu\text{m}$ ). 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 orgaaniliste happeid Shimadzu Prominence HPLC System, kasutati iooneraldus- kolonni. Vedelikkromatograafiga Aminex HPX-87H (300 mm x 7,8 mm). Kolonni temperatuur 60 kraadi, voolukiirus oli 0,6 ml/min ja orgaaniliste hapete detekteerimiseks kasutati PDA 15 detektorit lainepekkusel 210 nm. Analüüsiaeg oli 26 min.

- Orgaaniliste hapete ja alkoholide profiilis ilmnnesid 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 tarvitab tüvi *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 esimese 24 tunni kultiveerimise jooksul kasvukeskkonnast ära ligikaudu 99,5 protsendi ja anaeroobses keskkonnas 97,8 protsendi kasvukeskkonnas olemasolevast tsitraadist.
- 30 Anaeroobses keskkonnas kultiveerimisel oli *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 jooksul ära tarvitanud 4,8 protsendi 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 protsendi 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 protsendi CO<sub>2</sub>) ja anaeroobsel (CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>: 5/90/5 protsendi) 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
etanol	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

15 orgaaniliste hapete ja alkoholide profiili taimse materjali fermenteerimise käigus.

Metoodika. 226 g vegetatiivses kasvufaasis (V6-V8) maisitaimi

(*Zea mays* L.) hakiti, homogeniseeriti veega laboratoories

segistis Bagmixer 400 (Interscience, Prantsusmaa) 6 minuti

20 jooksul, filtreeriti, tsentrifuuugiti 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*

25 *buchneri* BioCC 228 DSM 32651 kultuurid suspendeeriti

peptoonevees 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 protsendi CO<sub>2</sub>) 25 kraadi juures 24, 48 ja 72 tundi.

Gaaskromatograafiliselt määrati orgaaniliste hapete ja alkoholide profiili gaaskromatograafiga Agilent 6890A, 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.

Vedelikkromatograafiliselt määrati orgaaniliste happeid Shimadzu Prominence HPLC System`iga, kasutati iooneraldus-15 kolonni Vedelikkromatograafiga Aminex HPX-87H (300 mm x 7,8 mm). Kolonni temperatuur 60 kraadi, voolukiirus oli 0,6 ml/min ja orgaaniliste hapete detekteerimiseks kasutati PDA detektorit laine pikkusel 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 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
etanol	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

25 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).

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

5 mikroaeroobses ja anaeroobses keskkonnas kultiveerimisel 25 kraadi juures.

Laktobatsilli tüvede *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 ja *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651

10 antimikroobsete omaduste hindamiseks patogeenide vastu kasutati joonkülvimeetodit (Hutt P, Shchepetova J, Loivukene K, Kullisaar T, Mikelsaar M. Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against enteric and uropathogens. J Appl Microbiol. 2006; 100(6):1324-32).

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

20

Tabel 6. *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 ja *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 antimikroobne aktiivsus patogeenidele modifitseeritud MRS agarsöötmel joonkülvi meetodil (sihtmikroobi kasvupidurdus millimeetrites) mikroaeroobses (10 protsendi CO<sub>2</sub>) ja anaeroobses (CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>: 5/90/5 protsendi) 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 subsp. 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; keskmne 13,79-17,11; tugev >17,12.

Inhibitsioonitsoon anaeroobses keskkonnas (mm-s): nõrk

<10,67; keskmne 10,66-14,94; tugev >14,95.

5

Mikroaeroobses keskkonnas omasid mõlemad tüved võrdsealt tugevat antimikroobset toimet (Tabel 6). Anaeroobses keskkonnas omas *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 mõnevõrra tugevamat toimet testitud patogeenide 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 pärnseente vastu

15 auk-diffusioonimeetodil agarsöötmel.

48 tunni vanusest laktobatsilli kultuurist valmistati suspensioon peptonvees 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 protsentti CO<sub>2</sub>) ja anaeroobselt (CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>: 5/90/5 protsentti) 25 kraadi juures 48 ja 72 tundi. Mikroobirakud eemaldati

tsentrifuugimisel (4500rpm, 10 min). Supernatant steriliseeriti filtreerimise teel ja kontsentreeriti lüofiliseerimisel. Lüofilisaat resuspendeeriti 10-kordses 10 mM äädikhappes. Kuus maisisilost isoleeritud metsikut 5 pärmitüve külvati ühtlase kihina PCA-söötmele (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 10 esine, + nõrk toime, pärmi kasv häiritud, ++ pärmi kasv pidurdunud, nähtav selge pidurdustsoon, +++ pärmi kasv tugevasti pidurdunud, nähtav lai selge pidurdustsoon.

15 *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 poolt produtseeritud antimikroobsed ühendid inhibeerivad taimset päritolu pärmeente kasvu tugevamalt võrreldes tüvega *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650. *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 tekitas juba 48 tunni jooksul 20 pärnide kasvu tugevasti inhibeerivaid ühendeid, tekitades agarsöötmel laia selge pidurdustsooni supernatanti sisaldava augu ümber, samas kui tüve BioCC 203 supernatant vaid häiris pärnide kasvu.

25 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.

30 Metoodika. 226 g vegetatiivses kasvufaasis (V6-V8) maisitaimi (*Zea mays* L.) hakiti, homogeniseeriti veega laboratoories 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) agaril kasvatatud *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 ja 5 *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 protsendi CO<sub>2</sub>) 10 25 kraadi juures 24, 48 ja 72 tundi.

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

Saagis =  $\log N_t - \log N_0$  us N<sub>t</sub> on bakterite arv mingil ajamomendil; N<sub>0</sub> on bakterite arv 0 ajamomendil

15 n=  $\log N_t - \log N_0 / \log 2$ , kus N<sub>t</sub> on bakterite arv mingil ajamomendil; N<sub>0</sub> on bakterite arv 0 ajamomendil

V=  $\log N_t - \log N_0 / 0,301 \times t$ , kus anti mikroobsed N<sub>t</sub> on bakterite arv mingil ajamomendil; N<sub>0</sub> on bakterite arv 0 ajamomendil ja t tähistab konkreetset aega.

20

Tabel 7. *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 ja *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 kasvudünaamika mikroaeroobsel (10 protsendi CO<sub>2</sub>) kultiveerimisel 25 kraadi 25 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 generatsiooni vörra kiirema kasvuga esimese 24 tunni jooksul ja 2,4 generatsiooni vörra kiirem 48 tunni jooksul vörreldes 5 tüvega *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 (Tabel 7).

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

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

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

Järgnevalt läbi viidud uuringud: pH taseme ja fermentatsiooni 20 kvaliteedi määramine 90-l päeval. Viidi läbi kaks aeroobse stabiilsuse katset. Esimene katse tehti pärast 49-päevast säilitusaega kahe aeroobse stressiga (24 tunni järel, 28. päeval ja 42. päeval). Aeroobse stabiilsuse katse viidi läbi kontrollitud temperatuuriga ruumis ligikaudu 20 kraadi 25 juures. Temperatuurid fikseeriti iga 4 tunni aja järel seadmetega PS-ES Datalogging system.

Algmatjali keemiline koostis on esitatud Tabelis 8.

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))

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

10 **Tabel 9.** Maisisordist „Cathy“ mikroorganismide *L. buchneri* BioCC 203 DSM 32650 ja *L. buchneri* BioCC 228 DSM 32651 abil valmistatud silode keemilise koostise, toiteväärtsuse 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
Etanol, 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.
- Säilitamisaja pikendamisel 90-päevani suurennes 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. Silokindlustus lisandite *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 kuivaine sisaldusega ( $\leq$  20 protsent) maisist (*Zea mays*, maisisort 'Dorka') mikroorganismi tüvede *L. buchneri* BioCC 203 DSM 32650 ja *L. buchneri* BioCC 228 DSM 32651 abil

valmistasid 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  $1 \times 10^5$  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 valmistasid silod ja 10 silokindlustuslisandita valmistasid kontrollsilod) valmistasid viies korduses. Katsesilod avati peale 90 päevast sileerimist. Katsesilod avati peale 90 päevast sileerimist.

Algmatjali 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 aeroobsest ebastabiiliseks kui selle geomēetrisest 20 keskpunktist mõõdetud temperatuur ületas 3 kraadi võrra ambientset temperatuuri. Temperatuuri muutuseid ajas mõõdeti 9 päeva (216 tunni) vältel. Ruumi (ambientne temperatuur) ja katsesilode temperatuurid fikseeriti iga tunni aja tagant seadmetega Comet Temperature Data Logger S0141.

25 Siloproove analüüsiti üldtunnustatud metodikate järgi (AOAC. 2005. Official methods of analysis of AOAC International, 18<sup>th</sup> ed. Association of Official Analytical Chemists International, Gaithersburg, MD, USA).

Kuivainesisalduse määramisel kuivatati siloproov termostaadis 30 130 kraadi juures konstantse kaaluni. Toortuhasisalduse leidmiseks põletati siloproovi kuus tundi muhvelahjus temperatuuril 550 kraadi. Proteiinisisaldus määratati analüsaatoriga Kjeltec™ 2300 Kjeldhali meetodil (Nx6,25). Toorkiud määratati W. Hennebergi ja F. Stohmanni metoodika

järgi. Silos sisalduvate hapete ja etanooli sisalduse määramiseks kasutati gaaskromatograafi Agilent 7890A. Ammoniaakläämmastiku sisaldus üldläämmastikust määratigi analüsaatoriga Kjeltec™ 2300. Silo happesus määratigi pH-meetriga Hanna Instruments HI 2210.

Tabel 10. Algmateriali keemiline koostis

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

Kõikide silode kuivainesisaldus oli ≤18 % (Tabel 11). Siiski 10 olid maisisordist 'Dorka' ja *L. buchneri* tüvega BioCC 203 DSM 32650 või *L. buchneri* tüvega BioCC 228 DSM 32651 valmistatud silod heade fermentatsiooni näitajatega (Tabel 11). Piimhape oli domineeriv hape kõikides silodes. *L. buchneri* tüvega BioCC 203 DSM 32650 valmistatud silodes oli kõrgem äädikhappe 15 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).

20 Tabel 11. Maisisordist 'Dorka' mikroorganismide *L. buchneri* BioCC 203 DSM 32650 ja *L. buchneri* BioCC 228 DSM 32651 abil valmistatud silode keemilise koostise, toiteväärtsuse 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
Etanol, 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. Hallituste hulgad olid sileeritavas materjalis suhteliselt kõrged, klostriidide ja pärmitase oli alla määramispiiri.

- 5 Tüvega *L. buchneri* BioCC 203 DSM 32650 või *L. buchneri* BioCC 228 DSM 32651 valmistatud siloproovide sisaldasid väga suurtes hulkades piimhappebaktereid ( $>8,0 \log_{10}$  pmü / g silos) ja siloproovides domineerisid lisatud tüved endogeensete piimhappebakterite üle. Piimhappebakterite hulk 10 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 15 valmistatud siloproovides

Näitaja	Algmaterjal		Kontroll		<i>L. buchneri</i> BioCC 203 DSM 32650	<i>L. buchneri</i> BioCC 228 DSM 32651	
	Kesk-mine, $\log_{10}$	SD	Kesk-mine, $\log_{10}$	SD	Kesk-mine, $\log_{10}$	SD	
Piimhappe-bakterid	3,80	0,32	4,56	0, 62	8,3	0,0 3	8,25 0,5 5
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 arvutatav

Silo aeroobse stabiilsuse katses läks kontrollsilodest kuumaks neli silo viiest. Keskmiseks aeroobseks stabiilsuseks 20 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 ( $\leq$  20 protsent) silos piimhappe sisaldust, 10 inaktiveeris mikroobide ja pärnide aktiivsust, kaitstes silo kuumenemise eest ja seeläbi parandas silo aeroobset stabiilsust pärast silo avamist, pikendades silo säilitusaega.

## PATENDINÕUDLUS

1. Isoleeritud mikroorganismi tüvi *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651.
- 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 sisaldav sööt.
- 10 5. Sööt vastavalt punktile 4, milleks on fermenteeritud sööt, nt silo.
6. Mistahes punktile 1 - 2 vastava mikroorganismi kasutamine söödalisisandina.
- 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 ( $\leq$  20 protsendi) 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 toitainete kadude vähendamiseks.
- 25 11. Mistahes punktile 1 - 2 vastava mikroorganismi kasutamine sööda fermenteerimisel patogeensete mikroobide toime allasurumisel ja pärmeente kasvu pidurdamiseks, mis seisneb mistahes punktile 1 - 2 vastava mikroorganismi lisamises fermenteeritavale söödale.

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