



Uue põlvkonna probiootikumide koosluste tootmise arendamine kasutades unikaalsete substraatide lähenemist

Bakalaureusetöö

Üliõpilane: Liselle Kaldaru, 206249LAAB

Juhendaja: Anna Kattel, TFTAk, teadur

Õppekava: Rakenduskeemia, toidu- ja geenitehnoloogia

Tallinn 2023



Developing production of next generation probiotic co-cultures using a unique substrate approach

Bachelor's thesis

Student: Liselle Kaldaru, 206249LAAB

Supervisor: Anna Kattel, TFTAK, cultivation researcher

Curriculum: Applied Chemistry, Food and Gene Technology

Tallinn 2023

Autorideklaratsioon

Kinnitan, et olen koostanud antud lõputöö iseseisvalt ning seda ei ole kellegi teise poolt varem kaitsmisele esitatud. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on töös viidatud.

Autor: Liselle Kaldaru

[allkiri ja kuupäev]

Töö vastab bakalaureusetööle esitatavatele nõuetele.

Juhendaja: Anna Kattel

[allkiri ja kuupäev]

Töö on lubatud kaitsmisele.

Kaitsmiskomisjoni esimees: Katrin Laos

[allkiri ja kuupäev]

Sisukord

Annotatsioon.....	5
Abstract	6
Kasutatud lühendite loetelu.....	7
Sissejuhatus.....	8
1. Kirjanduse ülevaade	9
1.1. Traditsioonilised probiootikumid	9
1.2. Uue põlvkonna probiootikumide kandidaadid.....	10
1.3. Koosluste kultiveerimine	11
1.3. Isotermiline mikrokalorimeeter	11
2. Töö eesmärgid.....	13
3. Materjalid ja meetodid.....	14
3.1. Kasutatud bakteritüved.....	14
3.2. Bakteritüvede kasvu mõõtmine erinevate süsinikuallikate juuresolekul	14
3.2. Koosluste kasvu uurimine	15
4. Tulemused.....	17
4.1. Erinevate süsinikuallikate mõju bakteritüvede kasvule.....	17
4.2. <i>A. colihominis</i> 'e ja <i>B. caccae</i> ' kooslus	18
4.3. <i>F. prausnitzii</i> ', <i>B. adolescentis</i> 'e ja <i>B. faecis</i> 'e kooslus.....	20
4.4. Peamised järeldused.....	24
Kokkuvõte.....	25
Tänuõnad.....	26
Kasutatud allikad.....	27

Annotatsioon

Uue põlvkonna probiootikumide kandidaadid on spetsiifilised tüved, millega on nähtud ravivat ja ennetavat mõju põletikuliste soolehaiguste ja muude seisundite vastu. Nende kasvatamine kooslustes oleks tööstuslikult kasulik ning võib sümbiootiliselt kandidaatide kasvu ja tootlikkust soodustada.

Käesolevas lõputöös uuriti isotermilise mikrokalorimeetriga viie uue põlvkonna probiootikumi kandidaadi kasvu 14 erineva süsinikuallika juuresolekul. Saadud kasvukiiruste järgi valiti igale bakteritüvele unikaalne substraat ning koostati kaks kooslust: *A. colihominis* ja *B. caccae*; *B. adolescentis*, *B. faecis* ja *F. prausnitzii*. Mõlema koosluse kasvu mõõdeti unikaalsete substraatide juuresolekul nii monokultuuride kui ka kooslusena.

A. colihominis'e ja *B. caccae*' puhul ei soodustanud koosluses kasvamine bakteritüvede kasvu ega tootmisvõimet. *F. prausnitzii*', *B. faecis*'e ja *B. adolescentis*'e puhul soodustas koosluses kasvamine esimesel päeval *F. prausnitzii*' kasvu, järgmistel päevadel ei olnud erinevust võrreldes monokultuuride summeeritud toodetud soojustega.

Kasvugraafikud ning HPLC andmed näitasid, et mõlemast kooslusest arenes mitu paralleeli kasutama lisaks oma unikaalsele substraadile ka muu koosluses oleva tüve substraati. Selle vältimiseks peab edaspidi arvestama lisaks kasvukiirusele substraatide tarbimise kiirust ning unikaalsete substraatide mõju uurimisel saadud teadmisi tekkinud biomassi kogustest.

Abstract

The candidates for the new generation of probiotics are specific strains that have been observed to have therapeutic and preventive effects against inflammatory bowel diseases and other conditions. Cultivating them in co-cultures would be industrially beneficial and may symbiotically promote the growth and productivity of the candidates.

In this thesis, the growth of five candidates for the new generation of probiotics was screened using an isothermal microcalorimeter in the presence of 14 different carbon sources. Based on the obtained growth rates, a unique substrate was selected for each bacterial strain, and two co-cultures were formed: *A. colihominis* and *B. caccae*; *B. adolescentis*, *B. faecis*, and *F. prausnitzii*. The growth of the strains was screened in the presence of the unique substrates as monocultures and in co-culture.

For *A. colihominis* and *B. caccae*, the growth in the co-culture did not promote the growth or production capacity of the bacterial strains. In the case of *F. prausnitzii*, *B. faecis*, and *B. adolescentis*, growth in the co-culture promoted the growth of *F. prausnitzii* on the first day, but there was no significant difference in comparison to the summed heat produced by the monocultures in the following days.

The growth curves and HPLC data showed that evolution occurred in multiple parallels in both co-cultures, where strains started using substrates from other strains present in the co-culture in addition to their unique substrate. To avoid this, future studies must consider the rate of substrate consumption in addition to the growth rate and utilize the knowledge of the generated biomass gained from screening unique substrates.

Kasutatud lühendite loetelu

A. colihominis – *Anaerotruncus colihominis*

B. adolescentis – *Bifidobacterium adolescentis*

B. caccae – *Bacteroides caccae*

B. faecis – *Blautia faecis*

F. prausnitzii – *Faecalibacterium prausnitzii*

HPLC – kõrgsurvevedelikkromatograafia (ing. *high-performance liquid chromatography*)

IMC – isothermiline mikrokalorimeeter (ing. *isothermal microcalorimeter*)

PBS – fosfaatpuhverlahus (ing. *phosphate-buffered saline*)

Sissejuhatus

Probiotikumid on tuntud oma ohutu ja kasuliku mõju tõttu peremeesorganismile, parandades soolestiku mikrofloora tasakaalu ning leevendades erinevaid haiguseid (Soccol et al., 2010). Nende populaarsuse kasvades on probiotikumide turg saavutanud 2022. aastal tuluväärtuse 57,8 miljardit dollarit (52,8 miljardit eurot) (MarketsandMarkets, 2022). Hoolimata nende positiivsetest omadustest on probiotikumide mõju liiga varieeruv, et neid saaks pidada kliiniliselt efektiivseteks või kasutada spetsiifiliste haiguste raviks (Zhang et al., 2022).

Kliiniliselt tõhusamateks peetakse probiootiliste mikroorganismide kindlaid tüvesid, mida nimetatakse uue põlvkonna probiotikumideks (López-Moreno et al., 2021). Nende kandidaadid on näidanud positiivset mõju põletikuliste soolehaiguste, sealhulgas Crohni tõve (Pesce et al., 2022), *Clostridium difficile* infektsiooni (Hickson, 2011), ülekaalulisuse ja muude haiguste või seisundite ravimisel või ennetamisel (López-Moreno et al., 2021).

Põhiliselt kultiveeritakse tänapäeval tööstusbiotehnoloogias kasutatavaid mikroobitüvesid ükshaaval, et organismide kasv oleks kontrollitud ning kasvukeskkond võimalikult saastusevaba. Siiski on märgatud, et mikroorganismide koosluses kasvatamine võib olla efektiivsem ja tööstuslikult kasulik, kui nende erinevate ensümaatiliste ja metaboolsete radade vahel tekib sünergia. (Bader et al., 2010)

Hetkel puudub tehnoloogia keeruliste probiootiliste bakterikoosluste efektiivseks tootmiseks. Sageli toodetakse üksikud liigid eraldi ning segatakse need hiljem kokku, kuid see ei ole tõhus kümnete või sadade liikide tootmiseks. Stabiilsete koosluste tööstuslikul tasemel tootmise tehnoloogia oleks vajalik mikroorganisme sisaldavaid või mikroobseid terapeutilisi tooteid valmistavatele ettevõtetele, näiteks Lallemand, 4D Pharma PLC ja Enterome.

Antud töö aitab kaasa tehnoloogia arendamisele, mis keskendub probiootilistele bakteriliikidele spetsiifiliste kasvusubstraatide leidmisele ning nende andmete põhjal moodustatud koosluste kasvu uurimisele.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Traditsioonilised probiootikumid

Probiootikumid on defineeritud kui elus mikroorganismid, mis on peremeesorganismi tervisele piisavas koguses manustatuna kasulikud. Nende soodne mõju on olnud teada juba sajandeid ning probiootilisi baktereid sisaldavaid toite nagu keefir, hapupiim ja kumõss on kasutatud tervist edendavatel eesmärkidel (Soccol et al., 2010). Toidus sisalduvate kindlate bakteriliikide oletatav kasu tervisele toodi esmakordselt välja 20. sajandi alguses, kui vene bioloog Ilja Metchnikoff väitis, et fermenteeritud jogurtis olevad *Lactobacillus bulgaricus* ja *Streptococcus thermophilus* pikendavad eluiga ning parandavad tervist (Soccol et al., 2010). Esimest korda kasutasid sõna “probiootikum” teadlased Lilly ja Stillwell aastal 1965 (Gupta & Garg, 2009).

Ideaalne probiootikum peab vastama kindlatele kriteeriumitele, mis sisaldab mikroorganismi võimeid ja kasu peremeesorganismile. Probiootikum peab saama hakkama suuõõne lagundavate ensüümidega, mao ja soolestiku madala pH ja happeliste ühenditega ning temperatuurimuutusega. Samuti on tähtis, et probiootikum suudab kleepuda soolestiku epiteeliumile ning väldib seega peristaltika tõttu välja uhumist. Soolestikus võitlevad probiootikumid patogeensete ühendite või organismide vastu ning tugevdavad immuunsüsteemi (de Melo Pereira et al., 2018). Lisaks peavad nad olema ohutud, inimese tervisele kasuliku mõjuga ja mõjutama kohalikku metabolismi (Gupta & Garg, 2009).

Populaarseimad probiootikumidena tarvitatud mikroorganismid kuuluvad Laktobatsillide, Bifidobakterite ja Streptokokkide perekondadesse, kuid on kasutatud ka enterokokke ja pärme. Igal tüvel, seejuures ka samast liigist pärinevatel, on erinev probiootiline potentsiaal ja mõju. (Soccol et al., 2010)

Laktobatsillid on aerotolerantsed või anaeroobsed kepikujulised bakterid, mis ei moodusta spoores ning värvuvad Gram-positiivselt (Soccol et al., 2010). Neid leidub peamiselt soolestikus, kuid ka süljes ja genitaaltraktis. Laktobatsillide toodetud atsetaat, propionaat ja laktaat võivad alandada soolestiku pH-d, inhibeerides seega patogeensete kasvu. Levinuimad liigid soolestikus on *Lactobacillus brevis*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. fermentum*. Laktobatsille kasutatakse toidutööstuses näiteks jogurti, juustu, hapukapsa ja -kurkide tootmiseks. (Christine M. Slover & Larry Danziger, 2008)

Bifidobaktereid kirjeldatakse kui Gram-positiivseid ja katalaas-negatiivseid anaeroobe, mis ei moodusta samuti spoores. Nad võivad olla erineva kujuga, näiteks lühikesed ja kõverad või Y-kujulised pulgad. Hetkel kuulub Bifidobakterite perekonda 30 liiki, eraldatud nii inimestest, loomadest, reoveest kui ka fermenteeritud piimast. Bifidobakterid on inimese soolestiku heaolu jaoks väga olulised, tugevdades immuunsust ning kaitstes maosolepõletiku vastu (Gomes & Malcata, 1999). Nende arvukus inimese soolestikus ja genitaaltraktis sõltuvad toitumisharjumustest ja vanusest (Soccol et al., 2010).

1.2. Uue põlvkonna probiootikumide kandidaadid

Kuigi probiootikumite kasutamisel on nähtud haiguseid leevendavat mõju üleüldiselt soolestiku mikrofloora tasakaalu taastamise või uuendamiseks, ei ole need kliiniliselt efektiivsed ega spetsiifilised (Zhang et al., 2022). Kindlatel probiootikumide tüvedel on aga eriomased positiivsed efektid haiguste ravimisel, mistõttu kutsutakse neid uue põlvkonna probiootikumideks (López-Moreno et al., 2021).

Soolestiku mikrobiomiga seotud haiguste ravimisel on kasutatud ka fekaalse mikrobiota siirdamist, millega on nähtud märgatavat mõju põletikuliste soolehaiguste, neuropsühhiaatriliste seisundite, autoimmuunhaiguste ja allergiate taandamisel. Arvukatel juhtudel on fekaalsel mikrobiota siirdamisel olnud aga negatiivsed tagajärjed, nende hulgas viiruslikud ja bakteriaalsed infektsioonid ning surm. (Wang et al., 2016) Defineeritud probiootikumide kooslused on sellega võrreldes ohutumad ja kontrollitavamad (Kurt et al., 2021).

Uue põlvkonna probiootikumid sisaldavad elus mikroorganisme ning neid saab kasutada haiguse või seisundi ravimiseks või ennetamiseks, kui need on läbinud kliinilised katsed. Uue põlvkonna probiootikumide kandidaatide hulka kuuluvad näiteks *Akkermansia muciniphila*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bacteroides fragilis*, *Eubacterium hallii* ja *Roseburia* spp. puhaskultuurid. (Zhang et al., 2022)

Põletikuliste soolehaiguste, näiteks Crohni tõve ja haavandilise koliidi korral on inimestel mikrofloora tasakaal häiritud. Tavaliselt väheneb mõlema haigusega soolestikus Firmikuutide ja Bakteroideste osakaal ning suureneb negatiivsete omadustega Proteobakterite ja Aktinobakterite oma. Soole ärrituse leevendamiseks on kasutatud lisaks ravimitele erinevaid probiootilisi mikroorganisme, nende seas Bifidobakterite ja Laktobatsillide liike, kuid ainult probiootikumidest erilist kasu ei ole nähtud. (Pesce et al., 2022)

Antibiootikumide kasutamine häirib samuti soolestiku mikrobiomi ning kaitse patogeensete mikroobide vastu nõrgeneb, põhjustades kahjulike *Clostridium difficile* (CD), *Salmonella* ja *Staphylococcus aureus*'e kasvu (Hickson, 2011). *Clostridium difficile* infektsiooni tõttu võib tekkida tõsine kõhulahtisus või pseudomembranoosne koliit (Kondepudi et al., 2014), mis võivad lõppeda surmaga (Hickson, 2011). Varasemalt on näidatud probiootikumide positiivset mõju CD infektsioonile, kui neid on kasutatud koos prebiootikumide (Kondepudi et al., 2014) või muude nende mõju parandavate lisanditega, näiteks ksülitooliga (Rätsep et al., 2017), kuid traditsioonilised probiootikumid üksi piisavat kaitset ei anna. Teistel kindlatel tüvedel, näiteks *Lactobacillus rhamnosus* GG-I, on aga võimalus olla kliiniliselt efektiivsemad. (Hickson, 2011)

Uue põlvkonna probiootikumide positiivset mõju on märgatud ka ülekaalulisuse korral. Ülekaalulistel inimestel on tihti soolestikus rohkem Firmikuute ja vähem Bakteroideseid, normaalkaalus inimestel aga vastupidi. Uue generatsiooni probiootikumide tüved võivad aidata nende tasakaalu taastada. Samuti võivad need osaleda diabeedi, metaboolsete sündroomide, maksahaiguste ja endokriinsüsteemiga seotud häirete ravis. (López-Moreno et al., 2021)

1.3. Koosluste kultiveerimine

Enamik tööstusbiotehnoloogia produkte on tänapäeval toodetud protsessidega, mis põhinevad mikroobitüvede ükshaaval kultiveerimisel. Selline meetod võimaldab hoida kultivatsiooni saastusevabana ning kontrollida mikroobide keskkonda, kasvu ja produktide tekkimist. Teatud juhtudel võib aga osutada kasulikumaks kultiveerida mikroobid koosluses, kus toimub substraatide lagundamine ja ainevahetus mitmete mikroobide kombineeritud metaboolse aktiivsuse tõttu. (Bader et al., 2010)

Mikroobidevahelistel interaktsioonidel on tähtis roll, kuna ühe koosluses oleva mikroobi kasv või metaboliitide teke võivad olla võimendatud või pärsitud mõne teise koosluses oleva mikroobi elutegevuse tõttu. Mitmed mikroorganismid võitlevad substraatide pärast ning on välja arendanud mitmeid kaitsemehhanisme teiste organismide vastu. Nende kaitsemehhanismide hulka kuuluvad näiteks hapete või muude ühendite tootmine teiste mikroobide kasvu inhibeerimiseks ning substraadi sidumine raskesti lagundatavateks ühenditeks. (Bader et al., 2010)

Koosluses olevad erinevad tüved võivad elada ka sümbioosis ning võimendada üksteise kasvu ja tootlikkust. Kasvukiirus võib suureneda vahelduvate kasvufaktorite tõttu, näiteks piimhappebakteritel, või tänu ühe tüve ensümaatilisele aktiivsusele, mis annab nii teisele tüvele substraadi. Lisaks võib aeroobse mikroorganismi hapniku tarbimine aidata kaasa anaeroobsete bakterite kasvule, tekitades neile sobivamad kasvutingimused (Bader et al., 2010). Tööstuses võimaldab koosluste kultiveerimine toota unikaalseid keemilisi ühendeid (Marmann et al., 2014) ning kasutada odavamaid substraate kui glükoos, vähendades nii tootmiskulusid (Bader et al., 2010).

Mikroorganismide kooslustes tekkivat sünergiat kasutatakse aina rohkem tööstusbiotehnoloogia erinevates valdkondades: reovee puhastamises, biogaasi tootmises, mulla tervendamises ja toiduainetööstuses. Viimases kasutatakse kooslusi peamiselt juustu, jogurti, hapukapsa, haputaigna ja muude probiootiliste toodete valmistamisel. (Bader et al., 2010)

1.3. Isotermiline mikrokalorimeeter

Mikroobsete protsesside hindamiseks ning mikroorganismide tuvastamiseks ja eristamiseks on mikrobioloogias võimalik kasutada isotermilist mikrokalorimeetrit (IMC, ing. *isothermal microcalorimeter*). IMC mõõdab bioloogilistel protsessidel tekkivat soojusvoogu, mis on proportsionaalne protsessi toimumise kiirusega. (Braissant et al., 2010)

Enamike isotermiliste mikrokalorimeetrite tööpõhimõtte põhineb konduktsioonil (Wadsö, 2002). Reaktsioonianumas tekkinud soojus kandub soojusvõtjasse (heat sink), mille temperatuur ei muutu suure soojusmahtuvuse tõttu. Soojusvahetus reaktsioonianuma ja soojusvõtja vahel toimub termopildi kaudu, mis mõõdab eralduvat või neelduvat soojust. Kogu protsessi ajal on võimalik jälgida reaajas soojusvoo muutust ning seega ka mikroorganismi metaboolse aktiivsuse muutusi. (Braissant et al., 2010)

Isotermilisel kalorimeetril on mitmeid eeliseid. Seade on väga tundlik, tuvastades soojuste eraldumist ka väikese mikroorganismide kontsentratsiooni korral, vahemikus 25000...100000 bakterit/ml. Nii madalat bakterikontsentratsiooni ei suuda laialdaselt kasutatav spektrofotomeeter mõõta. (Braissant et al., 2010)

Samuti on IMC väga täpne. Temperatuuri on võimalik seada 0,02 °C täpsusega vahemikus 15-300 °C ning reaktsiooni ajal kõigub see vaid 0,1 °C. Soojusvoo mõõtmise vahemik on suur ning kaldub tavaliselt kõrvale vaid 0,2 W ööpäeva jooksul. See tagab bakterite arvu dünaamilise mõõtmise suure täpsuse, mida ei ole võimalik saavutada muude bakterite arvu määramiseks kasutatavate meetoditega, nende hulgas plaatimine koos kolooniate loendamise. (Braissant et al., 2010)

Lisaks on kalorimeetri kasutamine lihtne ja proove saab kasutada peale soojusvoo mõõtmist ka teiste analüüside jaoks, kuna ampullide sisu jääb puutumatuks (Braissant et al., 2010).

2. Töö eesmärgid

Töö eesmärgid on järgmised:

- leida viiele uue põlvkonna probiootikumi kandidaadile unikaalne substraat, mis tagaks liikide kasvu koosluses;
- kasvatada kandidaate kooslustena ning analüüsida kasvu stabiilsust.

3. Materjalid ja meetodid

3.1. Kasutatud bakteritüved

Töös kasutati järgmisi bakteritüvesid: *Anaerotruncus colihominis* (DSM 17241), *Bifidobacterium adolescentis* (DSM 20087), *Bacteroides caccae* (DSM 19024), *Blautia faecis* (DSM 27629), *Faecalibacterium prausnitzii* (DSM 17677). Tüved on pärit DSMZ kogust (Saksa mikroorganismide ja rakukultuuride kogu).

3.2. Bakteritüvede kasvu mõõtmine erinevate süsinikuallikate juuresolekul

3.1.1. Söötme valmistamine

Söötme komponendid (Tabel 1) kaaluti kolme erinevasse anumasse, et vältida sadestumist ja Maillard'i reaktsiooni suhkrute ja aminohapete vahel, ning lahustati ultrapuhtas vees. Valmistati 20-kordsed lahused järgnevatest süsinikuallikatest: D-glükoos, D-mannoos, D-galakturonaat, D-müo-inositol, laktoos, N-atsetüül-D-glükoosamiin, L-fukoos, D-sorbitool, L-arabinoos, D-ksüloos, ksülitool, D-riboos, D-mannitool ja D-lüksoos. Nende lõppkontsentratsioon söötmes oli 27,75 mM. Süsinikuallikate hulka kuulusid monosahhariidid, suhkuralkoholid ja suhkurhapped, kuna analüütilised meetodid nende kvantifitseerimiseks on täpsemad kui polümeeride jaoks.

Peale 15 minutit autoklaavimist 121 °C juures ja jahutamist segati söötmelahused laminaari all kokku, lisati vitamiinid, hemiin ja ultrapuhas vesi. 16 tuubi pipeteeriti söödete ning 14 neist lisati substraadilahust nii, et nende kontsentratsioon oleks söötmetes võrdne (27,75 mM). Söötmeid hoiti üleöö anaeroobses kambris (COY box, Coy Laboratory Products Inc., Grass Lake, MI, USA), mis sisaldab ligikaudu 88% N₂, 10% CO₂, 2% H₂. Enne eksperimenti mõõdeti söötmete pH ning lisati vajadusel 3 M NaOH lahust, kuni iga söötme pH oli vahemikus 7,0 ± 0,1.

Tabel 1. Söötme komponendid 1 L kohta.

Komponent	1 L kohta
Kasitoon (Tryptone plus), g	2,5
Pärmiekstrakt (BioSpringer), g	2,5
L-tüstüstiin, g	1
K ₂ HPO ₄ , g	2,93
KH ₂ PO ₄ , g	4,65
(NH ₄) ₂ SO ₄ , g	0,9
NaCl, g	0,9
KOH, g	0,28
NaHCO ₃ , g	1
MgSO ₄ × 7H ₂ O, g	0,09
CaCl × 2H ₂ O, g	0,09
Hemiin, mg	10
Biotiin, µg	10

Kobalamiin, µg	10
4-aminobensoehape, µg	30
Püridoksamiin, µg	150
Foolhape, µg	50

3.1.2. Toodetud soojushulga mõõtmine isotermilise mikrokalorimeetriga

Ekspirimendi jaoks vajalikud bakteritüved tsentrifugeeriti 14 000 g juures 2 minutit ning suspendeeriti fosfaatpuhverlahuses (PBS, ing. *phosphate-buffered saline*) ja 1% L-tüsteiini hüdrokloriidi lahuses nii, et iga bakteri optiline tihedus 600 nm juures oleks väärtusega 1 (Ultrospec 10, Biochrom, Cambridge, UK). Seejärel pipeteeriti mikrokalorimeetri vialidesse 1,98 ml vastavat söödet ning 20 µl inokulaati. Vialid suleti hermeetiliselt ja paigutati isotermilisse mikrokalorimeetrisse (TAM IV-48, TA Instruments, New Castle, DE, USA) 37 °C juurde 72 tunniks. Katse lõppedes kanti proovid üle 1,5 ml tuubidesse ning mõõdeti nende optiline tihedus 600 nm juures. Proovid tsentrifugeeriti 14 000 g ja 4 °C juures 5 minutit ning supernatandid säilitati -20 °C juures.

3.2. Koosluste kasvu uurimine

3.2.1. Söötme valmistamine

Söötme komponendid (Tabel 1) kaaluti kolme erinevasse anumasse ning lahustati ultrapuhtas vees. Lisaks valmistati 20-kordsed substraadilahused D-arabinoosist, D-mannitoolist, D-galakturonaadist ja L-fukoosist, mida lahjendati lõppkontsentratsioonini 5,55 mM. Peale 15 minutit autoklaavimist 121 °C juures ja jahutamist segati söötmelahused laminaari all kokku, lisati vitamiinid, hemiin ning ultrapuhas vesi. Sööde jagati kahe pudeli vahel ning pipeteeriti mõlemasse igat vajalikku substraadilahust. Söötmeid hoiti üleöö anaeroobses kambris (COY box, Coy Laboratory Products Inc., Grass Lake, MI, USA). Enne eksperimenti mõõdeti söötmete pH ning lisati vajadusel 3 M NaOH lahust, kuni söötmete pH oli vahemikus 7,0 ± 0,1.

3.2.2. Toodetud soojushulga mõõtmine isotermilise mikrokalorimeetriga

Ekspirimendi jaoks vajalikud bakteritüved tsentrifugeeriti 14 000 g juures 2 minutit ning suspendeeriti vastavas söötmes, viies optilise tiheduse väärtuseni 1 (600 nm juures). Bakterikultuuri inokulaadi kontsentratsiooniks valiti 5% ning iga viali lõppmaht oli 2 ml. Seega pipeteeriti monokultuuride proovidesse 1,9 ml söödet ja 100 µl inokulaati, kahe tüvega koosluse proovidesse 1,8 ml söödet, 100 µl *Anaerotruncus colihominis*'t (*A. colihominis*) ja 100 µl *Bacteroides caccae*'d (*B. caccae*) ning kolme tüvega koosluse proovidesse 1,7 ml söödet, 100 µl *Bifidobacterium adolescentis*'t (*B. adolescentis*), 100 µl *Blautia faecis*'t (*B. faecis*) ja 100 µl *Faecalibacterium prausnitzii*'t (*F. prausnitzii*).

Vialid suleti hermeetiliselt ja paigutati isotermilisse mikrokalorimeetrisse (TAM IV-48, TA Instruments, New Castle, DE, USA) 37 °C juurde 24 tunniks. Iga annuskultuuri lõppedes viidi uude viali 100 µl kasvanud kultuuri ja 1,9 ml värsket söödet. Kokku tehti kolm annuskultuuri ning mõõdeti iga annuskultuuri proovide optiline tihedus 600 nm juures (Ultrospec 10, Biochrom, Cambridge, UK).

Proovid tseentrifuugiti 14 000 g ja 4 °C juures 5 minutit ning supernatandid ja pelletid säilitati -20 °C juures.

3.2.3. HPLC

Proovide supernatandid filtreeriti (0,2 µm) ning kõrgsurvevedelikkromatograafia (Waters 2695 HPLC system; Waters Corporation, Milford, MA, USA) abil määrati atsetaadi, butüraadi, etanooli, metaanhape, isobutaanhape, isovaleriinhape, laktaadi, propionaadi, suktsinaadi ja pentaanhape kontsentratsioonid. Lisaks määrati kooslusesse lisatud substraatide kontsentratsioonid – kahe bakteritüvega koosluses D-mannitool ja L-arabinoos ning kolme bakteritüvega koosluses D-mannitool, D-galakturonaat ja L-fukoos.

HPLC jaoks kasutati HPX-87H kolonni (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) ja isokraatlist elueerimisrežiimi 0,005 M H₂SO₄ lahusega kiirusel 0,6 ml/min, kolonni temperatuur oli 35 °C. Süsteem oli varustatud RI ja UV detektoritega (Waters Corporation), kvantifitseerimiseks võrreldi andmeid standardkõveratega (Tabel 2).

Tabel 2. Kvantifitseerimiseks kasutatud HPLC standardid koos kontsentratsiooniga.

Standardaine	mmol/L
Atsetaat	24,41
Butüraat	11,24
Etanool	125,55
Isobutaanhape	11,24
Isovaleriinhape	9,69
Laktaat	17,54
Metaanhape	29,04
Pentaanhape	9,69
Propionaat	20,56
Suktsinaat	12,18
D-galakturonaat	22,74
D-mannitool	26,95
L-arabinoos	33,02
L-fukoos	30,48

4. Tulemused

4.1. Erinevate süsinikuallikate mõju bakteritüvede kasvule

Valitud bakteritüvede toodetud soojust mõõdeti isotermilises mikrokalorimeetris, et teada saada, kuidas soodustavad erinevad süsinikuallikad iga tüve kasvu eelnevalt kirjeldatud söötmes. Tulemused on toodud Tabelis 3. Nendele lisaks oli igas katses baassöötmega negatiivne kontroll, mis ei sisaldanud lisatud substraati ega inokulaati, ning teine ainult baassöödet sisaldav proov (ilma lisasüsinikuallikata), mis oli inokuleeritud. Bakteritüve sisaldav proov, millesse ei olnud lisatud unikaalse substraadi kandidaati, võimaldas näha, kas ja kuidas erineb bakteritüve kasv baassöötmes ja lisatud substraadiga söötmes.

Tabel 3. Bakteritüvede keskmised kasvukiirused (μ , h^{-1}) erinevatel süsinikuallikatel. Kasvukiirused on arvatud toodetud soojushulga põhjal ning seejärel on arvatud kolme bioloogilise paralleeli aritmeetiline keskmine ja standardhälve. ND – ei tuvastatud lisasüsinikuallika mõju kasvule.

	<i>A. colihominis</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>B. caccae</i>	<i>B. faecis</i>	<i>F. prausnitzii</i>
D-glükoos	0,49 ± 0,06	0,34 ± 0,12	0,99 ± 0	0,21 ± 0,12	0,66 ± 0,03
D-mannoos	0,52 ± 0,03	ND	0,91 ± 0,02	ND	ND
D-galakturonaat	ND	ND	0,71 ± 0	0,03 ± 0,01	0,70 ± 0,05
D-müo-inositol	ND	ND	ND	0,07 ± 0,01	ND
Laktoos	ND	0,51 ± 0,02	0,80 ± 0,01	0,24 ± 0,09	0,41 ± 0,04
N-Ac-D-glükoosamiin	0,50 ± 0,11	ND	0,79 ± 0	0,05 ± 0,01	0,25 ± 0,02
L-fukoos	ND	ND	0,65 ± 0,01	0,52 ± 0,16	ND
D-sorbitool	ND	ND	ND	0,06 ± 0	ND
L-arabinoos	ND	0,37 ± 0,12	0,88 ± 0,02	0,18 ± 0,03	ND
D-ksüloos	0,20 ± 0,01	0,19 ± 0,10	0,80 ± 0,04	0,23 ± 0,07	ND
Ksülitool	ND	ND	ND	ND	ND
D-riboos	0,30 ± 0,01	0,22 ± 0,03	0,58 ± 0,02	0,16 ± 0	ND
D-mannitool	0,60 ± 0,10	0,53 ± 0,01	ND	0,09 ± 0,07	ND
D-lüksoos	ND	ND	0,26 ± 0,09	0,03 ± 0	ND

Saadud andmete järgi moodustati kaks teoreetiliselt sobivat kooslust: *A. colihominis* (D-mannitool) ja *B. caccae* (L-arabinoos) ning *B. adolescentis* (D-mannitool), *B. faecis* (L-fukoos) ja *F. prausnitzii* (D-galakturonaat).

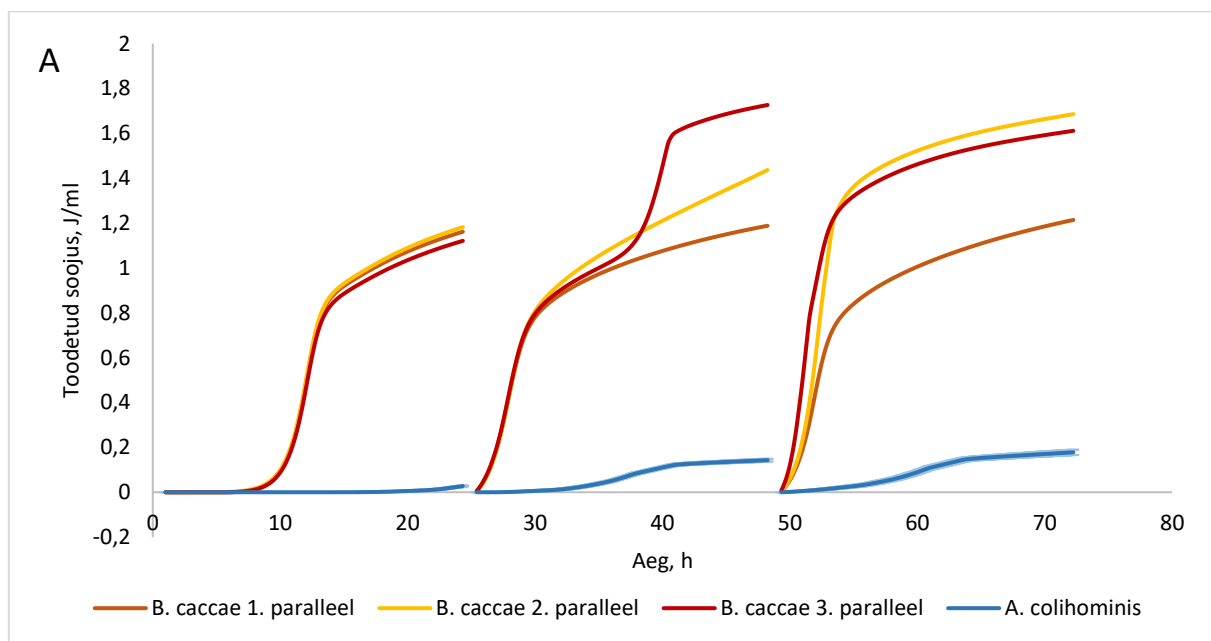
Sobivuse hindamisel võeti arvesse süsinikuallikate mõju bakterite kasvule ja tüvede metabolismitüübid (Tabel 4). Igal koosluses oleval tüvel pidi olema substraat, millega oli kasvukiirus piisavalt suur ning mida teised tarbida ei suutnud. See vähendas võimalust, et mõni kiirem tüvi tarbib lisaks enda substraadile mõne teise tüve oma ning pärsib seega viimase kasvu. Koosluse teiseks tingimuseks olid tüvede erinevad metabolismitüübid, et toodetud orgaanilised happed oleksid erinevad ning soodustaksid teiste tüvede kasvu risttoitumise näol.

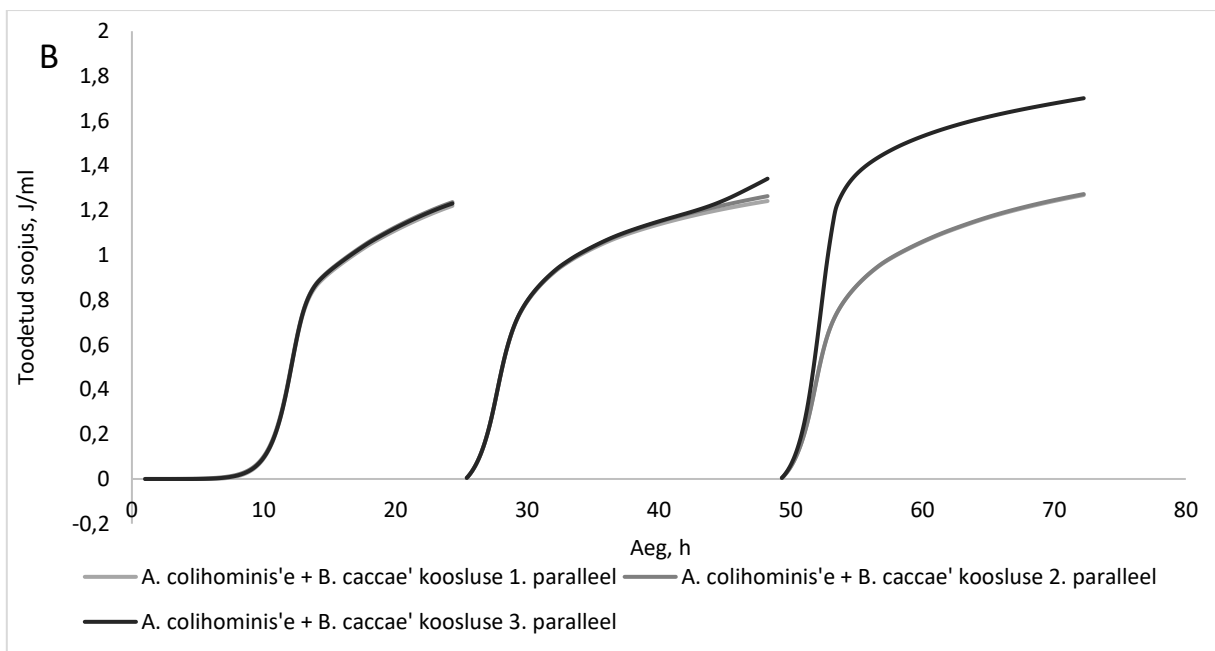
Tabel 4. Valitud bakteritüvedest moodustati kaks teoreetiliselt sobivat kooslust, kus igal tüvel oli unikaalne substraat ning erinev metabolismitüüp.

Bakteritüvi	Substraat	Peamised metabolismiproductid
<i>A. colihominis</i>	D-mannitool	butüraat
<i>B. caccae</i>	L-arabinoos	suktsinaat / propionaat
<i>F. prausnitzii</i>	D-galakturonaat	butüraat
<i>B. faecis</i>	L-fukoos	atsetaat / laktaat / etanool
<i>B. adolescentis</i>	D-mannitool	atsetaat / etanool / laktaat

4.2. *A. colihominis*'e ja *B. caccae*' kooslus

A. colihominis ja *B. caccae* kasvasid söötmes, mille substraatideks olid D-mannitool ja L-arabinoos. *A. colihominis*'e kolme annuskultuuri keskmine toodetud soojus oli $0,12 \pm 0,08$ J/ml ning *B. caccae*' oma $1,31 \pm 0,14$ J/ml (Tabel 5). Toodetud soojushulk kasvas mõlemal tüvel iga päevaga, kuid *A. colihominis*'e oma jäi võrreldes *B. caccae*-ga kogu katse käigus madalaks (Joonis 1). Teisel päeval on näha, et *B. caccae*' kolmanda paralleeli soojushulk suureneb mitmejärguliselt, mis võib viidata mitmele kasvufaasile. See tähendab omakorda, et *B. caccae* võis kasutada süsinikuallikaks mõlemat söötmes olevat substraati.





Joonis 1. Isotermilise mikrokalorimeetriga mõõdetud monokultuuride ja koosluse toodetud soojused. (A) *A. colihominis'* ja *B. caccae'* monokultuuride kasvud. *A. colihominis'* jaoks on arvatud aritmeetiline keskmine ja standardhälve ($n=3$). (B) *A. colihominis'* ja *B. caccae'* koosluse kasv iga annuskultuuriga.

Kuna esimesel päeval pidid bakterid harjuma uue keskkonna ja temperatuurimuutusega, olid mõlema tüve lag-faasid pikemad esimesel päeval ning lühenesid iga annuskultuuriga. *A. colihominis'* kasvukiirus jäi kolme päeva jooksul madalaks, keskmiselt $0,18 \pm 0,15 \text{ h}^{-1}$, kolmanda päeva lõpuks saavutati stabiilsus. *B. caccae'* kasvukiirus oli keskmiselt $0,91 \pm 0,18 \text{ h}^{-1}$, kuid teisel ja kolmandal päeval erinesid paralleelid üksteisest.

A. colihominis' ja *B. caccae'* koosluses oli kolme annuskultuuri keskmine toodetud soojus $1,31 \pm 0,09 \text{ J/ml}$. Soojushulk kasvas iga päevaga ja oli üldiselt stabiilne, välja arvatud kolmas paralleel kolmandal päeval. Lag-faas oli esimesel päeval pikem (9,22 h), järgmistel päevadel aga märgatavalt lühem: teise ja kolmanda annuskultuuri keskmine lag-faas kestis $1,61 \pm 0,04 \text{ h}$. Koosluse kasvukiirus oli keskmiselt $0,86 \pm 0,10 \text{ h}^{-1}$, mis oli madalam kui *B. caccae'* monokultuuri oma.

Lisaks võrreldi koosluste maksimaalset toodetud soojust monokultuuride toodetud soojuste summaga. Kui koosluse toodetud soojushulk on suurem kui monokultuuride summa oma, võib järeldada, et koosluses kultiveerimine võimendas ühe või mitme bakteritüve kasvu. *A. colihominis'* ja *B. caccae'* koosluse maksimaalne toodetud soojus ületas esimesel päeval monokultuuride summeeritud soojushulka, kuid kolme annuskultuuri keskmine väärtus oli monokultuuride summast madalam (Tabel 5).

Tabel 5. *A. colihominis*'e ja *B. caccae*' monokultuuride ja koosluse keskmised kasvuparameetrid. Lisatud on standardhälve (n = 3). Monokultuuride summa jaoks lag-faasi ja kasvukiirust ei arvatud.

	Maksimaalne toodetud soojus, J/ml	Lag-faas, h	Kasvukiirus, h ⁻¹
<i>A. colihominis</i>	0,12 ± 0,08	15,02 ± 8,15	0,18 ± 0,15
<i>B. caccae</i>	1,31 ± 0,14	4,14 ± 4,45	0,91 ± 0,18
<i>A. colihominis</i> 'e ja <i>B. caccae</i> ' kooslus	1,31 ± 0,10	4,15 ± 4,39	0,86 ± 0,10
Monokultuuride summa	1,43 ± 0,22	-	-

HPLC andmed näitasid, et *A. colihominis* tarbis igas annuskultuuris substraati mannitooli, kuigi suur osa sellest jäi tarbimata, ning tootis oma metabolismitüübile vastavalt butüraati (Tabel 6). Samuti tarbis *B. caccae* arabinoosi ning tootis propionaati ja suksinaati. Huvitaval kombel on üks *B. caccae* paralleel teisest annuskultuurist ja kaks paralleeli kolmandast annuskultuurist tarbinud samuti mannitooli, mida süsinikuallikate mõju uurimisel ei toimunud. See viitab võimalikule evolutsioonile annuskultuuride ajal; *B. caccae* tarbis ära enda substraadi arabinoosi ning seejärel mannitooli (*A. colihominis*'e substraat). Koosluses tarbitud ja toodetud ainete kogus oli lähedane *B. caccae*' tulemustega, sümbioosi ei toimunud.

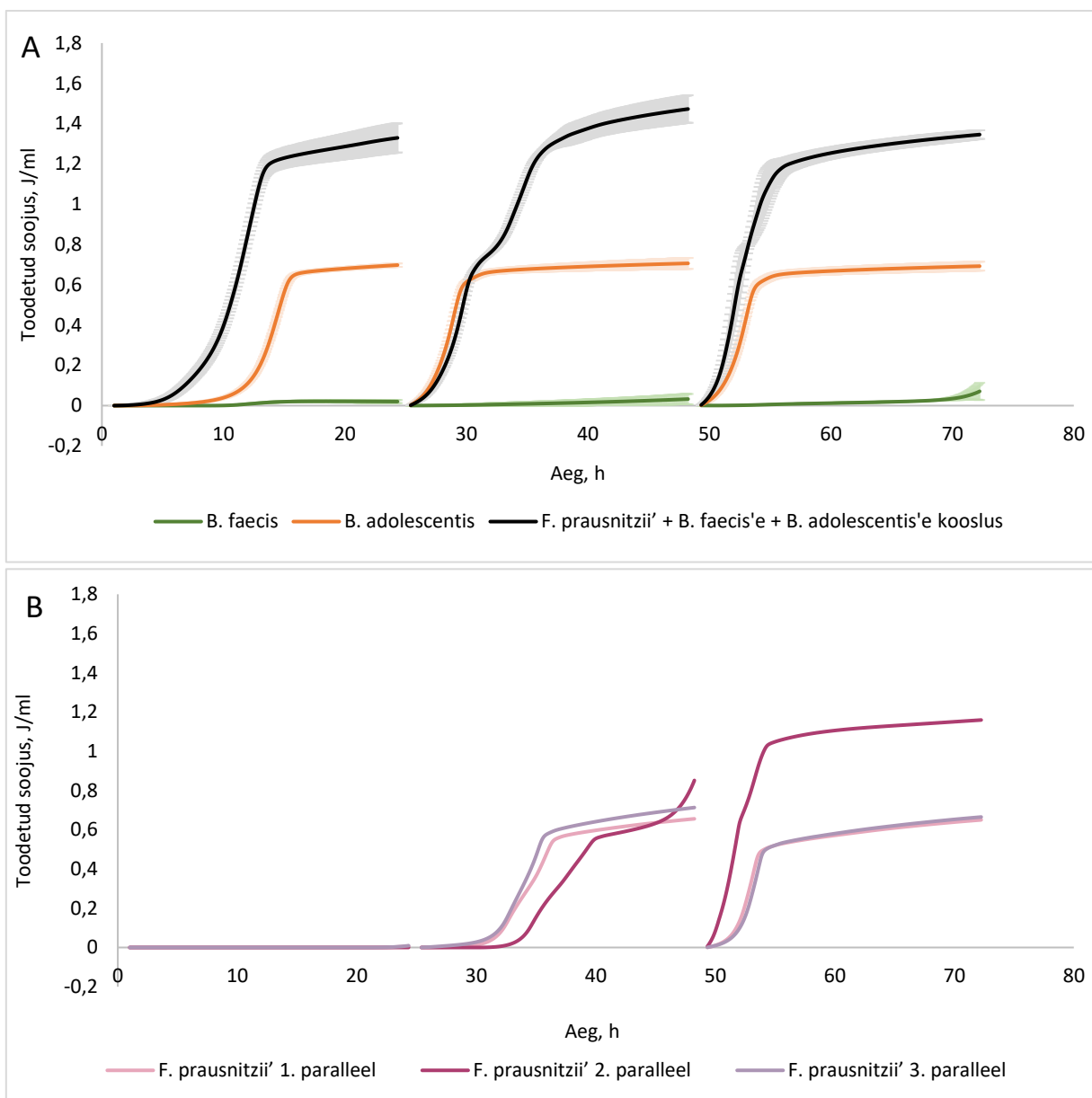
Tabel 6. *A. colihominis*'e ja *B. caccae*' monokultuuride ja koosluse tarbitud substraadide ja toodetud metabolismiproduktide väärtused (mM). Sarnaste bioloogiliste paralleelide korral on võetud nende aritmeetiline keskmine ja standardhälve (n=3), kaalukamate erinevuste esinemisel on välja toodud kõik paralleelid.

		Mannitool	Arabinoos	Atsetaat	Butüraat	Etanool	Metanaat	Propionaat	Suksinaat
1. annus- kultuur	<i>A. colihominis</i>	-0,64 ± 0,04	-0,64 ± 0,02	0,49 ± 0,03	0,33 ± 0,02	0 ± 0	-0,01 ± 0,02	-0,27 ± 0	-0,11 ± 0
	<i>B. caccae</i>	-0,9 ± 0,38	-4,72 ± 0,29	3,18 ± 0,29	0 ± 0	0 ± 0	0,43 ± 0,06	3,41 ± 0,26	3,4 ± 0,26
	Kooslus	-0,8 ± 0,06	-4,7 ± 0	3,85 ± 0,04	0,28 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,42 ± 0	3,45 ± 0,02	3,39 ± 0,04
2. annus- kultuur	<i>A. colihominis</i>	-0,79 ± 0,03	-1,04 ± 0,01	1,49 ± 0,03	0,83 ± 0,02	0,3 ± 0,10	0,14 ± 0,06	-0,27 ± 0	-0,11 ± 0,01
	<i>B. caccae</i> 1	-1,33	-4,74	3,28	0	0	0,33	3,80	3,18
	<i>B. caccae</i> 2	-1,43	-4,72	3,91	0	0,92	1,37	4,02	3,39
	<i>B. caccae</i> 3	-6,39	-4,77	6,11	0	7,52	10,57	3,75	3,31
	Kooslus 1	-1,07	-4,73	4,06	0,39	0,42	0,38	3,84	3,42
	Kooslus 2	-0,93	-4,73	4,18	0,36	0,33	0,38	3,96	3,50
	Kooslus 3	-1,87	-4,75	4,60	0,37	1,78	2,15	3,89	3,43
3. annus- kultuur	<i>A. colihominis</i>	-0,74 ± 0,01	-1 ± 0,06	1,43 ± 0,09	0,91 ± 0,08	0,3 ± 0,15	0,03 ± 0,15	-0,18 ± 0,16	-0,13 ± 0,30
	<i>B. caccae</i> 1	-0,85	-4,70	3,53	0	0	0,34	4,20	3,51
	<i>B. caccae</i> 2	-6,39	-4,85	5,80	0	5,46	10,05	3,35	2,66
	<i>B. caccae</i> 3	-6,39	-4,85	6,11	0	5,72	10,62	3,27	3,05
	Kooslus 1	-1,02	-4,70	4,04	0	0,34	0,41	3,85	3,48
	Kooslus 2	-0,92	-4,70	4,42	0,38	0,07	0,39	4,25	3,54
	Kooslus 3	-6,39	-4,85	6,97	0,28	5,06	11,38	4,00	3,14

4.3. *F. prausnitzii*', *B. adolescentis*'e ja *B. faecis*'e kooslus

F. prausnitzii', *B. adolescentis*'e ja *B. faecis*'e söötmes olid süsinikuallikateks D-galakturonaat, D-mannitool ja L-fukoos. *F. prausnitzii*' toodetud soojushulk oli keskmiselt 0,52 ± 0,45 J/ml, *B.*

adolescentis'e soojushulga väärtus $0,70 \pm 0,01$ J/ml ja *B. faecis*'e oma $0,04 \pm 0,03$ J/ml (Tabel 7). *B. adolescentis*'e ja *B. faecis*'e toodetud soojuse graafikud olid kolme päeva jooksul sarnased (Joonis 2), kuid *F. prausnitzii*' kasv erines annuskultuuride vahel märgatavalt. Teise paralleeli puhul on teisel päeval näha mitut kasvufaasi ning kolmandal päeval teistest paralleelidest suuremat toodetud soojushulka, seega *F. prausnitzii* võis kasutada süsinikuallikaks mitut lisatud substraati.



Joonis 2. Isotermilise mikrokalorimeetriga mõõdetud monokultuuride ja koosluse toodetud soojused. (A) *B. faecis*'e ja *B. adolescentis*'e monokultuuride, *F. prausnitzii*', *B. faecis*'e ja *B. adolescentis*'e koosluse kasvud. Iga annuskultuuri jaoks on arvatud aritmeetiline keskmine ja standardhälve ($n=3$). (B) *F. prausnitzii*' monokultuuri kasv.

Tüvede lag-faasid olid esimesel päeval väga pikad, teisel ja kolmandal päeval *F. prausnitzii*' ja *B. adolescentis*'e lag-faasid lühenesid ning saavutasid lähedase väärtuse. *B. faecis* alustas eksponentsiaalset kasvu alles kolmanda päeva viimastel tundidel, mistõttu kestis lag-faas keskmiselt $23,79 \pm 0,62$ h ning kasvukiirust polnud võimalik arvutada. *F. prausnitzii*' kasvukiirus oli kolme päeva kohta keskmiselt $0,47 \pm 0,47$ h⁻¹ ja *B. adolescentis*'e oma $0,68 \pm 0,11$ h⁻¹, suurenedes iga annuskultuuriga.

F. prausnitzii', *B. faecis*'e ja *B. adolescentis*'e koosluse toodetud soojushulk oli annuskultuure võrreldes ühtlase väärtusega, keskmiselt $1,38 \pm 0,08$ J/ml. Ka koosluse kasvugraafikul on näha mitmeefaasilist kasvu, mille tekitas ilmselt *F. prausnitzii*' mitme substraadi tarbimine. Lag-faas lühenes katse jooksul kolm korda ning lõppes varem kui monokultuuride omad. Kasvukiiruse väärtus suurenes iga annuskultuuri korral ning oli keskmiselt $0,70 \pm 0,26$ h⁻¹.

Esimesel päeval soodustas koosluses kultiveerimine bakterite kasvu, Jooniselt 2 on näha, et koosluse maksimaalne toodetud soojus on peaaegu kaks korda suurem kui monokultuuride summa. Monokultuuride summeeritud soojushulk suurenes teise ja kolmanda annuskultuuriga, kuna *F. prausnitzii* alustas kasvu, kuid koosluse oma märgatavalt ei muutunud. Seetõttu võib öelda, et *F. prausnitzii* kasvas koosluses juba esimese annuskultuuriga ning selle mõju teiste koosluses olevate tüvede kasvule või tootlikkusele jäi samaks. Kolmandal päeval ületas monokultuuride summa maksimaalne toodetud soojus koosluse oma, kuid koosluse keskmine väärtus oli suurem kui monokultuuride summa oma.

Tabel 7. *F. prausnitzii*', *B. faecis*'e ja *B. adolescentis*'e monokultuuride ja koosluse keskmised kasvuparameetrid. Lisatud on standardhälve (n = 3). Monokultuuride summa jaoks lag-faasi ja kasvukiirust ei arvatatud.

	Maksimaalne toodetud soojus, J/ml	Lag-faas, h	Kasvukiirus, h ⁻¹
<i>F. prausnitzii</i>	$0,52 \pm 0,45$	$11,52 \pm 11,41$	$0,47 \pm 0,47$
<i>B. faecis</i>	$0,04 \pm 0,03$	$23,79 \pm 0,62$	-
<i>B. adolescentis</i>	$0,70 \pm 0,01$	$4,90 \pm 4,83$	$0,68 \pm 0,11$
<i>F. prausnitzii</i> ', <i>B. faecis</i> ' ja <i>B. adolescentis</i> 'i kooslus	$1,38 \pm 0,08$	$3,25 \pm 2,14$	$0,70 \pm 0,26$
Monokultuuride summa	$1,26 \pm 0,47$	-	-

HPLC andmete põhjal (Tabel 8) käitusid *B. faecis* ja *B. adolescentis* ootuspäraselt. *B. faecis* alustas kasvu kolmanda päeva lõpus, seega ei olnud märkimisväärset muutust tema substraadi fukoosi tarbimisel; atsetaadi, laktaadi ja etanooli tootmine suurenes veidi. *B. adolescentis* tarbis oma substraati mannitooli ning tootis atsetaati, etanooli ja laktaati kogu katse vältel sarnastes kogustes.

Tabel 8. *F. prausnitzii*, *B. faecis*'e ja *B. adolescentis*'e monokultuuride ja koosluse tarbitud substraatide ja toodetud metabolismiproduktide väärtused (mM). Sarnaste bioloogiliste paralleelide korral on võetud nende aritmeetiline keskmine ja standardhälve (n=3), kaalukamate erinevuste esinemisel on välja toodud kõik paralleelid.

		Fukoos	Galakturonaat	Mannitool	Atsetaat	Butüraat	Etanool	Metanaat	Laktaat
1. annus-kultuur	<i>F. prausnitzii</i>	-0,37 ± 0,03	-0,59 ± 0,05	-0,32 ± 0,03	0,06 ± 0,06	0 ± 0	0 ± 0	-0,01 ± 0,06	0,01 ± 0,03
	<i>B. faecis</i>	-0,43 ± 0,09	-0,47 ± 0,07	-0,40 ± 0,09	0,31 ± 0,04	0 ± 0	0 ± 0	-0,43 ± 0	0,04 ± 0,01
	<i>B. adolescentis</i>	-0,30 ± 0,05	-0,10 ± 0,04	-5,81 ± 0	6,91 ± 0,07	0 ± 0	4,61 ± 0,38	3,8 ± 0,03	1,02 ± 0,01
	Kooslus	-0,28 ± 0,01	-4,38 ± 0	-5,82 ± 0,01	11,73 ± 0,04	0,97 ± 0,84	4,96 ± 0,32	5,6 ± 0,05	1,60 ± 0,02
2. annus-kultuur	<i>F. prausnitzii</i> 1	-0,48	-4,38	-0,46	5,04	1,23	0,27	2,58	0,23
	<i>F. prausnitzii</i> 2	-0,47	-4,38	-3,37	6,40	1,16	4,30	8,29	0,74
	<i>F. prausnitzii</i> 3	-0,48	-4,38	-0,48	5,02	1,12	0,31	2,43	0,20
	<i>B. faecis</i>	-0,36 ± 0,03	-0,34 ± 0,15	-0,35 ± 0,02	0,01 ± 0,01	0 ± 0	0 ± 0	-0,13 ± 0	-0,01 ± 0
	<i>B. adolescentis</i>	-0,41 ± 0,07	-0,12 ± 0,06	-6 ± 0	6,92 ± 0,12	0 ± 0	4,72 ± 0,40	3,74 ± 0,06	1,11 ± 0,01
	Kooslus	-0,50 ± 0,25	-4,38 ± 0	-6 ± 0	11,98 ± 0,91	1,35 ± 0,04	5,09 ± 0,42	5,58 ± 0,70	1,62 ± 0,21
3. annus-kultuur	<i>F. prausnitzii</i> 1	-0,22	-4,38	-0,22	5,58	1,32	0,20	2,54	0,39
	<i>F. prausnitzii</i> 2	-0,11	-4,38	-6	7,83	1,24	8,37	13,14	1,64
	<i>F. prausnitzii</i> 3	-0,18	-4,38	-0,18	5,57	1,44	0,42	2,51	0,31
	<i>B. faecis</i>	-0,24 ± 0,02	-0,22 ± 0,04	-0,88 ± 0,77	0,48 ± 0,40	0 ± 0	1,16 ± 1,19	1,22 ± 1,65	0,15 ± 0,21
	<i>B. adolescentis</i>	-0,17 ± 0,06	0,14 ± 0,05	-6 ± 0	7,20 ± 0,13	0 ± 0	4,54 ± 0,47	3,84 ± 0,07	1,19 ± 0,02
	Kooslus 1	-0,48	-4,14	-6	9,36	0,98	6,83	9,71	1,94
	Kooslus 2	-0,30	-4,38	-5,92	11,93	1,41	5,02	5,29	1,56
	Kooslus 3	-0,20	-4,17	-6	10,08	1,33	7,60	7,60	1,97

F. prausnitzii tarbis galakturonaati esimesel päeval vähe, kuid järgmistel annuskultuuridel tõusis tarbimine märgatavalt. Tema peamine metabolismiprodukt oli butüraat, mida toodeti teisel ja kolmandal päeval keskmiselt $1,25 \pm 0,12$ mM. Teise ja kolmanda annuskultuuri teised paralleelid, mille graafikud erinesid muudest paralleelidest, on tarbinud lisaks enda substraadile ka mannitooli ning tootnud rohkem atsetaati ja etanooli, mis kinnitab varasemat oletust paralleelide evolutsioneerumisest.

Koosluses tarbiti fukoosi ja mannitooli lähedaselt monokultuuride summeeritud tarbimisele, kuid *F. prausnitzii* substraati galakturonaati on tarbitud esimesel päeval rohkem kui monokultuuriga. See võib tähendada, et koosluses tekitas mõni tegur *F. prausnitzii*'le sobivama keskkonna, kui tal monokultuurina oli, ning ta kasvas koosluses juba esimese annuskultuuriga. Toodetud orgaaniliste hapete kogused on samuti sarnased monokultuuride summeeritud väärtustega.

4.4. Peamised järeldused

Bakteritüvede kasvu mõõtmisel erinevate süsinikuallikatega leiti häid unikaalse substraadi kandidaate igale tüvele, mis võimaldab moodustada erinevaid kooslusi järgnevateks katseteks.

Kuigi valitud bakteritüved sobisid teoreetiliselt koosluses kasvama, ei andnud katse kummagi koosluse puhul oodatud tulemust. Stabiilset kasvu ei saavutatud, kasvuparameetrid ning tarbitud ja toodetud ühendid erinesid nii annuskultuuride kui ka paralleelide vahel. Evolutsiooni vältimiseks tuleb võtta arvesse substraatide tarbimise kiirust, et ühelgi bakteritüvel ei tekiks võimalust kasutada süsinikuallikana mõne muu koosluses oleva tüve substraati. Lisaks on oluline arvestada koosluste koostamisel biomassi hulka, mis tekkis iga unikaalse substraadiga kasvamisel, et ühtlustada bakterite kasvu koosluses.

Kokkuvõte

Uue põlvkonna probiootikume peetakse traditsioonilistest probiootikumidest kliiniliselt efektiivsemateks ja spetsiifilisemateks. Nende tootmine kooslustes võib olla tööstuslikult tõhusam ning võimendada bakteritüvede kasvu ja mõju. Tehnoloogia stabiilsete koosluste tööstuslikul tasemel tootmiseks on vajalik erinevatele mikroorganismide sisaldavaid või mikroobseid terapeutilisi tooteid valmistavatele ettevõtetele.

Antud töö eesmärgiks oli leida viiele uue põlvkonna probiootikumi kandidaadile sobiv unikaalne süsinikuallikas ning kasvatada neid kooslustena, kasutades selleks isotermilist mikrokalorimeetrit.

Töös võrreldi 14 erineva süsinikuallika mõju kandidaatideks olevate bakteritüvede kasvule. Saadud kasvukiiruste põhjal moodustati kaks kooslust: *A. colihominis* ja *B. caccae*; *B. adolescentis*, *B. faecis* ja *F. prausnitzii*. Kooslusesse kuuluvate tüvede süsinikuallikad ning metabolismitüübid olid erinevad, et vältida üksteise substraatide tarbimist ja võimaldada teis(t)e tüve(de) toodetud orgaanilistest hapetest risttootumist.

A. colihominis'e ja *B. caccae*' koosluse maksimaalne toodetud soojus ja kasvukiirus olid kolme päeva jooksul ühtlased, kuid koosluses kasvamine ei soodustanud bakteritüvede kasvu ega tootmisvõimet. *A. colihominis*'e monokultuuri kasvuparameetrid jäid madalaks. Kasvugraafik ning HPLC andmed näitasid, et *B. caccae*' kolm paralleeli kahe annuskultuuri peale kasutasid oma unikaalsele substraadile lisaks ka *A. colihominis*'e substraati, oletatavasti toimus nende paralleelidega evolutsioon.

F. prausnitzii', *B. faecis*'e ja *B. adolescentis*'e puhul soodustas koosluses kasvamine esimesel päeval *F. prausnitzii*' kasvu, järgmistel päevadel ei olnud erinevust koosluse ning monokultuuride summeeritud toodetud soojuste vahel. *F. prausnitzii*' üks paralleel arenes samuti tarbima teise koosluses oleva bakteritüve substraati mannitooli, põhjustades mitu kasvufaasi.

Edaspidiste koosluste moodustamisel tuleb arvestada lisaks kasvukiirusele substraatide tarbimise kiirust ning unikaalsete substraatide mõju uurimisel saadud teadmisi tekkinud biomassi kogustest. Nii on suurem võimalus saavutada stabiilne kooslus ja vältida evolutsiooni.

Tänuõnad

Soovin südamest tänada oma juhendajat Anna Kattelit, kes abistas mind katsete läbiviimise, tulemuste analüüsimise ning käesoleva töö kirjutamise ja vormistamisega. Lisaks tänan Katrin Orrot ja retsensenti Rain Kuldjärve tähelepanu ja konstruktiivse kriitika eest.

Suured tänud ka Toidu- ja Fermentatsioonitehnoloogia Arenduskeskusele, mille ruume, seadmeid ja ressursse oli mul lõputöö koostamisel võimalik kasutada.

Kasutatud allikad

- Bader, J., Mast-Gerlach, E., Popović, M. K., Bajpai, R., & Stahl, U. (2010). Relevance of microbial coculture fermentations in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology*, *109*(2), 371–387. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04659.x>
- Braissant, O., Wirz, D., Göpfert, B., & Daniels, A. U. (2010). Use of isothermal microcalorimetry to monitor microbial activities. *FEMS Microbiology Letters*, *303*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01819.x>
- Christine M. Slover, & Larry Danziger. (2008). *Lactobacillus: a Review*.
- de Melo Pereira, G. V., de Oliveira Coelho, B., Magalhães Júnior, A. I., Thomaz-Soccol, V., & Soccol, C. R. (2018). How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. In *Biotechnology Advances* (Vol. 36, Issue 8, pp. 2060–2076). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.09.003>
- Gomes, A. M. P., & Malcata, F. X. (1999). *Bi®dobacterium spp. and Lactobacillus acidophilus: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics*.
- Gupta, V., & Garg, R. (2009). Probiotics. In *Indian Journal of Medical Microbiology* (Vol. 27, Issue 3, pp. 202–209). Medknow Publications and Media Pvt. Ltd. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.53201>
- Hickson, M. (2011). Probiotics in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and Clostridium difficile infection. In *Therapeutic Advances in Gastroenterology* (Vol. 4, Issue 3, pp. 185–197). <https://doi.org/10.1177/1756283X11399115>
- Kondepudi, K. K., Ambalam, P., Karagin, P. H., Nilsson, I., Wadström, T., & Ljungh, Å. (2014). A novel multi-strain probiotic and synbiotic supplement for prevention of Clostridium difficile infection in a murine model. *Microbiology and Immunology*, *58*(10), 552–558. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12184>
- Kurt, F., Leventhal, G. E., Spalinger, M. R., Anthamatten, L., von Bieberstein, P. R., Rogler, G., Lacroix, C., & de Wouters, T. (2021). *Co-cultivation is a powerful approach to produce a robust functionally designed synthetic consortium as a live biotherapeutic product (LBP)*.
- López-Moreno, A., Acuña, I., Torres-Sánchez, A., Ruiz-Moreno, Á., Cerk, K., Rivas, A., Suárez, A., Monteoliva-Sánchez, M., & Aguilera, M. (2021). Next generation probiotics for neutralizing obesogenic effects: Taxa culturing searching strategies. In *Nutrients* (Vol. 13, Issue 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu13051617>
- Marmann, A., Aly, A. H., Lin, W., Wang, B., & Proksch, P. (2014). Co-cultivation - A powerful emerging tool for enhancing the chemical diversity of microorganisms. In *Marine Drugs* (Vol. 12, Issue 2, pp. 1043–1065). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/md12021043>
- Pesce, M., Seguella, L., Del Re, A., Lu, J., Palenca, I., Corpetti, C., Rurgo, S., Sanseverino, W., Sarnelli, G., & Esposito, G. (2022). Next-Generation Probiotics for Inflammatory Bowel Disease. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23105466>

- Rätsep, M., Kõljalg, S., Sepp, E., Smidt, I., Truusalu, K., Songisepp, E., Stsepetova, J., Naaber, P., Mikelsaar, R. H., & Mikelsaar, M. (2017). A combination of the probiotic and prebiotic product can prevent the germination of *Clostridium difficile* spores and infection. *Anaerobe*, 47, 94–103. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.03.019>
- Soccol, C. R., Porto De Souza Vandenberghe, L., Spier, M. R., Bianchi, A., Medeiros, P., Yamaguishi, C. T., De, J., Lindner, D., Pandey, A., & Thomaz-Soccol, V. (2010). *The Potential of Probiotics: A Review*.
- Wadsö, I. (2002). Isothermal microcalorimetry in applied biology. In *Thermochimica Acta* (Vol. 394).
- Wang, S., Xu, M., Wang, W., Cao, X., Piao, M., Khan, S., Yan, F., Cao, H., & Wang, B. (2016). Systematic review: Adverse events of fecal Microbiota transplantation. In *PLoS ONE* (Vol. 11, Issue 8). Public Library of Science. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161174>
- Zhang, H., Duan, Y., Cai, F., Cao, D., Wang, L., Qiao, Z., Hong, Q., Li, N., Zheng, Y., Su, M., Liu, Z., & Zhu, B. (2022). Next-Generation Probiotics: Microflora Intervention to Human Diseases. In *BioMed research international* (Vol. 2022, p. 5633403). NLM (Medline). <https://doi.org/10.1155/2022/5633403>
- (2022, October). Retrieved from MarketsandMarkets: <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/probiotic-market-advanced-technologies-and-global-market-69.html>

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks¹

Mina, Liselle Kaldaru,

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose “Uue põlvkonna probiootikumide koosluste tootmise arendamine kasutades unikaalsete substraatide lähenemist”, mille juhendaja on Anna Kattel,

1.1 reprodutseerimiseks lõputöö säilitamise ja elektroonse avaldamise eesmärgil, sh Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogusse lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tallinna Tehnikaülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogu kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. Olen teadlik, et käesoleva lihtlitsentsi punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest ning muudest õigusaktidest tulenevaid õigusi.

_____ (kuupäev)

¹ Lihtlitsents ei kehti juurdepääsupiirangu kehtivuse ajal vastavalt üliõpilase taotlusele lõputööle juurdepääsupiirangu kehtestamiseks, mis on allkirjastatud teaduskonna dekaani poolt, välja arvatud ülikooli õigus lõputööd reprodutseerida üksnes säilitamise eesmärgil. Kui lõputöö on loonud kaks või enam isikut oma ühise loomingulise tegevusega ning lõputöö kaas- või ühisautor(id) ei ole andnud lõputööd kaitsvale üliõpilasele kindlaksmääratud tähtajaks nõusolekut lõputöö reprodutseerimiseks ja avalikustamiseks vastavalt lihtlitsentsi punktidele 1.1. ja 1.2, siis lihtlitsents nimetatud tähtaja jooksul ei kehti.