

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034933**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.04.08

(21) Номер заявки
201691804

(22) Дата подачи заявки
2015.02.25

(51) Int. Cl. *C12R 1/24* (2006.01)
C12N 1/22 (2006.01)
C12R 1/225 (2006.01)
A23K 1/00 (2006.01)
A23K 3/03 (2006.01)

(54) БЫСТРОДЕЙСТВУЮЩИЕ ШТАММЫ LACTOBACILLUS И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ АЭРОБНОЙ СТАБИЛЬНОСТИ СИЛОСА

(31) 14/200,231

(32) 2014.03.07

(33) US

(43) 2017.02.28

(86) PCT/US2015/017516

(87) WO 2015/134254 2015.09.11

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ПАЙОНИР ХАЙ-БРЕНД
ИНТЕРНЭШНЛ, ИНК. (US)**

(56) US-B1-6337068
US-B1-6326037

WEINBERG Z.G. ET AL.: "NEW TRENDS AND OPPOTUNITIES IN THE DEVELOPMENT AND USE OF INOCULANTS FOR SILAGE", FEMS MICROBIOLOGY REVIEWS, ELSEVIER, AMSTERDAM; NL, vol. 19, no. 1, 1 January 1996 (1996-01-01), pages 53-68, XP000960647, ISSN: 0168-6445, DOI: 10.1016/0168-6445(96)00025-3 cited in the application Item 4; page 59, right-hand column

(72) Изобретатель:
**Харман Элизабет, Рутерфорд
Уилльям, Смайли Бренда Кей (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Раскрыт способ обработки силоса для повышения аэробной стабильности путем усиления брожения и стабилизации силоса посредством подавления роста микроорганизмов, выбранных из дрожжей, плесени и спорообразующих бактерий, который позволяет осуществлять аэробное воздействие на более ранних сроках. Способ включает обработку силоса или корма композицией, содержащей штамм LN7125 *Lactobacillus buchneri*, или штамм LB5328 *Lactobacillus brevis*, или штамм LB7123 *Lactobacillus brevis* и их смеси, или мутант, который сохраняет активность в отношении консервирования силоса, присущую LN7125, LB5328 или LB7123, или антимикробные компоненты, полученные таким образом. Было обнаружено, что штаммы *Lactobacillus buchneri* и *Lactobacillus brevis*, раскрываемые в данном изобретении, после их очистки и выделения улучшают аэробную стабильность силоса, что позволяет подвергать его аэробному воздействию на более ранних сроках после начала силосования, чем в существующей практике.

B1

034933

034933

B1

Область изобретения

Изобретение относится к композициям и способам обработки животных кормов и консервирования силоса с целью повышения аэробной стабильности.

Предпосылки изобретения

Процесс силосования представляет собой способ консервирования влажных зеленых кормов, который используется во всем мире. На силос приходится более чем 200 млн т сухого вещества, заготавливаемого ежегодно только в Западной Европе и Соединенных Штатах. В этом процессе используется естественное брожение, при котором молочнокислые бактерии сбраживают водорастворимые углеводы с образованием органических кислот в анаэробных условиях. Это вызывает снижение pH, при котором затем подавляется развитие вредных микробов так, чтобы сохранять влажный зеленый корм.

Аэробная нестабильность является основной проблемой в производстве силоса. Традиционно рекомендуется подвергать силос брожению в течение не менее 30 дней перед использованием в корм, чтобы повысить усвояемость силоса. Даже до раскрывания хранилищ под выемку силос может подвергаться воздействию кислорода вследствие проблем, связанных с ведением хозяйства (т.е. плохая утрамбовка или герметизация). В этих аэробных условиях быстрый рост дрожжей и плесени вызывает разогрев и порчу силоса, понижая его питательную ценность. Использование в корм сельскохозяйственной культуры, которая не прошла надлежащего брожения, может понижать потребление сухого вещества (ПСВ), снижать молочную продуктивность и вызывать проблемы с пищеварением. Если отвести достаточно времени на брожение, то получается более съедобный и усвояемый корм для оптимального ПСВ и молочной продуктивности.

Аэробная нестабильность может вызывать проблемы даже в силосе с внесенным микробным препаратом, который прошел то, что традиционно считается "хорошим" брожением, характеризующееся быстрым снижением pH и низким конечным значением pH. Однако дрожжевые организмы, которые способствуют нестабильности в этих условиях, могут быть не чувствительны к кислотным условиям и метаболизировать молочную кислоту, произведенную молочнокислыми бактериями в ходе брожения.

При производстве силоса можно применять как химические, так и биологические добавки, чтобы содействовать созданию адекватного характера брожения, особенно в менее благоприятных условиях. Типичными химическими добавками чаще всего бывают органические кислоты, а биологические добавки включают бактериальные препараты и ферменты. Бактериальные препараты более предпочтительны, чем химические добавки, поскольку они безопаснее, легче в использовании, не вызывают коррозии сельскохозяйственной техники, не загрязняют окружающую среду и считаются натуральными продуктами.

Производство штаммов микробных препаратов для силоса и процесса силосования сложно и требует взаимодействия многих химических и микробиологических процессов. Различные штаммы даже одних и тех же видов не обладают одинаковыми свойствами и отличаются в отношении их ферментативных характеристик и получения. Кроме того, разные типы силоса и разные способы силосования выдвигают различные требования. В этой области техники существует постоянная потребность в усовершенствовании композиций и способов, направленных на улучшение аэробной стабильности силоса и повышение эффективности производства силосованных животных кормов.

Настоящее изобретение предлагает новые штаммы *L. buchneri* и *L. brevis* и их отличные комбинации для применения в качестве микробных препаратов для силоса.

Краткое описание изобретения

Варианты осуществления данного изобретения включают композиции для применения в качестве микробных препаратов для силоса, включающие сохраняющие качество силоса количества видов гетероферментативных молочнокислых бактерий и их смесей или их мутант и подходящий носитель. Композиции гетероферментативных молочнокислых бактерий, выделенные и очищенные, улучшают аэробную стабильность силосованных зеленых кормов, повышая брожение и стабилизацию силоса, что позволяет подвергать его более раннему аэробному воздействию. Такие композиции могут включать, но не ограничиваются этим, штамм LN7125 *Lactobacillus buchneri* (далее обозначаемый LN7125), имеющий патентное депонирование № NRRL B-50733, или штамм LB5328 *Lactobacillus brevis* (далее обозначаемый LB5328), имеющий патентное депонирование № NRRL B-50731, или штамм LB7123 *Lactobacillus brevis* (далее обозначаемый LB7123), имеющий патентное депонирование № NRRL B-50732 и их смеси, или мутант, который сохраняет активность в отношении консервирования силоса, присущую LN7125, LB5328 или LB7123, и носитель. Такие композиции могут содержать от примерно 10^1 до примерно 10^{11} жизнеспособных организмов на грамм сырого веса силоса, необязательно от примерно 10^2 до примерно 10^7 жизнеспособных организмов на грамм сырого веса силоса, например от примерно 10^3 до примерно 10^6 жизнеспособных организмов на грамм сырого веса силоса. Носителем в композициях вариантов осуществления может быть жидкость или твердое вещество, такие как карбонат кальция, крахмал или целлюлоза, но не ограничивается ими.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение теперь будет более подробно описано ниже в данном документе со ссылкой на прилагаемые таблицы, в которых приведены некоторые, но не все варианты осуществления настоящего изобретения. В самом деле это изобретение может быть осуществлено в различных модификациях, и

другие варианты осуществления данного изобретения, изложенные в данном документе, могут прийти на ум специалисту в данной области, к которой относится настоящее изобретение, при использовании идей, представленных в вышеприведенном описании и сопутствующих графических материалах. Таким образом, следует понимать, что настоящее изобретение не должно ограничиваться конкретными раскрытыми вариантами осуществления, и подразумевается, что в объем прилагаемой формулы изобретения включены модификации и другие варианты осуществления. Хотя в данном документе используются специальные выражения, они используются только в общем и описательном смысле, а не в целях ограничения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, применяемые в данном документе, имеют такое же значение, которое обычно понимается средним специалистом в области техники, к которой принадлежат варианты осуществления настоящего изобретения. Многие способы и материалы, подобные, измененные или эквивалентные описанным в данном документе, можно применять на практике в вариантах осуществления настоящего изобретения без дополнительного экспериментирования, в данном документе описаны предпочтительные материалы и способы. При описании и заявлении вариантов осуществления настоящего изобретения будет применяться приведенная далее терминология в соответствии с изложенными ниже определениями.

Единицы измерения, приставки и обозначения могут быть обозначены в форме, принятой в системе СИ. Числовые диапазоны, перечисляемые в описании, охватывают числа, определяющие диапазон, и включают каждое целое число в определенном диапазоне.

Форма единственного числа применяется в данном документе для обозначения одного или нескольких (т.е. по меньшей мере одного) грамматического объекта. Например, "элемент" означает один или несколько элементов.

В данном контексте "продуктивность животных" обозначает выход мяса, молока, яиц, потомства или работы.

В данном контексте "силосование" или "силосуемый" относится к способу анаэробной ферментации, используемому для сохранения зеленых кормов, незрелых зерновых культур и других культур биомассы для кормов и биотоплива. В некоторых вариантах осуществления способ силосования включает стадии приведения зеленых кормов в контакт с микробным препаратом и хранение смеси в анаэробных условиях. В некоторых вариантах осуществления способ силосования включает стадии хранения зеленых кормов в анаэробных условиях так, чтобы исключить попадание воздуха. Кормовые растения с внешним микробным препаратом, описанным в других разделах данного документа, также утрамбовывают и хранят так, чтобы исключить попадание воздуха. Содержание влаги в зеленых кормах может составлять от примерно 50% до примерно 80% в зависимости от хранения, степени сжатия и ожидаемой потери влаги во время хранения. Силосование может происходить в силосных бункерах, силосных кучах, силосных ямах, силосных рулонах или любым другим методом, пригодным для силосования выбранного растительного материала. Растительный материал с микробным препаратом, описанным в других разделах данного документа, силосуемый в течение любого периода времени, соответствующего приготовлению силоса с требуемым уровнем созревания. В некоторых вариантах осуществления силосование продолжается примерно 7, примерно 15, примерно 20, примерно 25, примерно 30, примерно 35, примерно 40, примерно 41, примерно 42, примерно 43, примерно 44, примерно 45, примерно 46, примерно 47, примерно 48, примерно 49, примерно 50, примерно 55, примерно 60, примерно 65, примерно 70 дней, примерно 4 месяца, примерно 8, примерно 12, примерно 18 или примерно 24 месяца или в течение любого периода времени, который специалист считает пригодным. Способ силосования может происходить при любой температуре окружающей среды, например при температуре окружающей среды, например 0-45°C. Температура силосуемого растительного материала может, однако, превышать 45°C. Созревший силос можно использовать в корм скоту, замораживать и хранить для последующего использования или вносить в генератор биогаза для производства биогаза.

В данном контексте "функциональный мутант" означает штамм бактерий непосредственно или опосредованно, полученный путем генетической модификации или использованием эталонного(ых) штамма(ов) и сохраняющий не менее 50% активности эталонного штамма. Генетическую модификацию можно получить любым путем, таким как, но не ограничиваясь этим, химические мутагены, ионизирующее излучение, мутагенез на основе транспозонов или конъюгацией, трансдукцией или трансформацией с использованием эталонных штаммов в качестве либо получателя, либо донора генетического материала.

В данном контексте следует понимать, что термин "виды гетероферментативных молочнокислых бактерий" включает виды *Leuconostoc*, некоторые *Lactobacilli*, *Oenococci* и *Weissella*, но не ограничивается ими. Гетероферменты производят молочную кислоту, этанол, уксусную кислоту и диоксид углерода в соотношениях, зависящих от природы субстрата.

В данном контексте следует понимать, что термин "виды гомоферментативных молочнокислых бактерий" включает некоторые *Lactobacilli* и большинство видов *Enterococci*, *Lactococci*, *Pediococci*, *Streptococci*, *Tetragenococci* и *Vagococci*, но не ограничивается ими, которые сбраживают гексозы по пути Эмбдена-Мейергофа (E-M). "Гомоферментативный" означает, что молочная кислота является основным метаболитом без образования диоксида углерода. Из каждой молекулы сахара с шестью атомами углерода гомоферментативные молочнокислые бактерии производят две молекулы молочной кислоты.

В данном контексте "изолированный" означает выделенный из естественного источника, включая, но не ограничиваясь этим, силос или другой растительный материал без внесенных в них бактерий.

В данном контексте "микробный препарат" относится к композиции, содержащей не менее одной бактериальной культуры и подходящий носитель. "Комбинированный микробный препарат" содержит не менее 2, не менее 3, не менее 4, не менее 5, не менее 6, не менее 7 или более бактериальных культур и подходящий носитель. Бактериальные культуры включают не менее одного бактериального штамма, включая, например, не менее 2, не менее 3, не менее 4, не менее 5, не менее 6, не менее 7 или более. Бактериальные культуры, полезные для способов и композиций, раскрываемых в данном документе, включают LN7125, LB5328 или LB7123, но не ограничиваются ими.

В данном контексте "предварительно засилосованный растительный материал" включает, но не ограничивается этим, травы, кукурузу, люцерну, пшеницу, плевел, зерновые, семена масличных культур, сорго, подсолнечник, ячмень и их смеси перед сбраживанием. Каждый из них можно успешно обрабатывать микробными препаратами вариантов осуществления настоящего изобретения. Микробные препараты вариантов осуществления настоящего изобретения также полезны для обработки кукурузы с высоким содержанием влаги (high moisture corn - HMC).

В данном контексте "семена масличных культур" включают подсолнечник, канолу, сою и их смеси, но не ограничиваются этим.

В данном контексте "очищенный" означает то, что виды или штаммы бактерий в значительной степени отделены от дрожжей, плесени и/или других видов или штаммов бактерий, находящихся в источнике, из которого они были выделены, и их состав обогащен по сравнению с этим источником.

Термин "силос" в данном контексте предназначен включать все типы сброженных сельскохозяйственных продуктов, включая, но не ограничиваясь этим, травяной силос, люцерновый силос, пшеничный силос, бобовый силос, подсолнечниковый силос, ячменный силос, силос из целого растения кукурузы (whole plant corn silage - WPCS), сорговый силос, сброженные злаки и смеси трав, и т.п.

Следует понимать, что в данном контексте термин "штамм" или "штамм(ы)" включает любой мутант или производное различных бактериальных штаммов, раскрываемых в данном документе, но не ограничивается этим, например штамм LN7125 *L. buchneri* (патентное депонирование № NRRL B-50733), или штамм LB5328 *L. brevis* (патентное депонирование № NRRL B-50731), или штамм LB7123 *L. brevis* (патентное депонирование № NRRL B-50732), которые сохраняют функциональную активность в отношении улучшения аэробной стабильности зеленых кормов, как описано и определено в способах и приемах, раскрываемых в данном документе.

Несколько выделенных и очищенных микроорганизмов улучшают аэробную стабильность силосованных зеленых кормов, повышая брожение и стабилизацию силоса, что позволяет подвергать его более раннему аэробному воздействию. Было показано, что определенные штамм(ы) видов *L. buchneri* или *L. brevis* повышают аэробную стабильность силоса не только тем, что снижают уровни молочной кислоты, но и тем, что производят вещество, которое подавляет микроорганизмы, способствующие аэробной нестабильности силоса. Не желая быть связанными какой-либо теорией, предполагают, что к такому результату приводит действие комбинации метаболитов. Кроме того, считается, что при метаболизме *L. buchneri* или *L. brevis* образуется как уксусная кислота, так и пропионовая кислота, о которых известно, что они подавляют рост дрожжей и плесени.

Основной целью силосования зеленых кормов является сохранение максимального количества исходного сухого вещества, питательных веществ и энергетической ценности сельскохозяйственной культуры для скармливания впоследствии. Способ может характеризоваться четырьмя основными фазами брожения силоса.

После герметизации хранилища первая фаза является аэробной, когда кислород по-прежнему присутствует между частями растения и значение pH равно 6,0-6,5. Эти условия позволяют продолжаться дыханию растений, активности протеазы и активности аэробных и факультативных аэробных микроорганизмов.

Вторая фаза представляет собой брожение, которое продолжается от нескольких дней до нескольких недель после того, как силос стал анаэробным. Происходит рост молочнокислых бактерий, которые становятся основной микробной популяцией, тем самым производя молочную и другие органические кислоты, снижая значение pH до 3,8-5,0.

Третья фаза - стабильная, в ходе которой происходит незначительное количество изменений в характеристиках зеленого корма, при условии, что воздух не проникает в хранилище.

Последней фазой является выемка и скармливание, когда силос в конечном счете разгружают и подвергают воздействию воздуха. Это приводит к повторной активации аэробных микроорганизмов, прежде всего дрожжей, плесени, бацилл и уксуснокислых бактерий, которые вызывают порчу.

Манера ведения хозяйства, которую можно использовать для предотвращения этого состояния, включает, но не ограничивается этим, соблюдение мер, улучшающих утрямку силоса в ходе процесса силосования, сжатие, герметичность, быстрое заполнение, уход за передней границей, а также соблюдение осторожности при выемке силоса на скармливание с тем, чтобы минимизировать аэрацию оставшегося силоса.

Подверженность силоса аэробной порче обуславливается физическими, химическими и микробиологическими факторами. Ведение хозяйства (сжатие, скорость разгрузки) значительно влияет на проникновение кислорода в силос. В ходе выемки воздух может проникать на расстояние вплоть до 1 м вглубь за переднюю границу силоса, и таким образом воздействие кислорода продлевается. Образующиеся при ферментации кислоты и pH задерживают скорость микробного роста, но на скорость порчи также влияют количество бактерий и скорость аэробного микробного роста на доступных субстратах.

Кисломолочные бактерии (LAB) являются частью нормальной микрофлоры растущих растений. LAB можно классифицировать как один или два типа в зависимости от основных конечных продуктов их метаболизма; гомоферментативными являются те, которые при метаболизме глюкозы образуют только молочную кислоту, а гетероферментативные - это те, которые производят молочную кислоту, этанол, ацетат и CO₂. Наличие этих типов весьма изменчиво как с точки зрения типа, как и количества, и меняется в зависимости от сельскохозяйственной культуры и местоположения.

Микробные препараты для силоса, содержащие, главным образом, гомоферментативные кисломолочные бактерии, стали преобладающими добавками во многих частях мира. Их действие заключается в ускорении быстрого и эффективного преобразования водорастворимых углеводов сельскохозяйственной культуры, приводящем к усиленному образованию молочной кислоты и быстрому снижению pH, и, таким образом, минимизации потери сухой массы. Микробные препараты могут также улучшать продуктивность животных. Однако гомоферментативные микробные препараты часто оказывают отрицательное действие на аэробную стабильность вследствие консервирования субстратов, которые легкодоступны вызывающим порчу организмам.

Концепция гетероферментативных молочнокислых бактерий в микробном препарате стала популярной в последнее время. Идея заключается в том, что повышенные уровни недиссоциированных летучих жирных кислот, таких как уксусная, могут ингибировать другие микробы, которые стимулируют аэробную порчу.

Гетероферментативные бактерии производят молочную кислоту, этанол, уксусную кислоту и диоксид углерода в соотношениях, зависящих от природы субстрата. Образующиеся ацетаты могут подавлять развитие пагубных организмов в силосе. Кроме того, гетероферментативные бактерии, такие как *Lactobacillus buchneri*, способны метаболизировать молочную кислоту до ацетата и 1,2-пропандиола в анаэробных условиях. При таких механизмах одна шестая часть углерода теряется на образование диоксида углерода в ходе брожения глюкозы и одна третья часть углерода молочной кислоты теряется в ходе анаэробного преобразования в уксусную кислоту. Однако малая потеря 1% или вплоть до 2% сухого вещества незначительна по сравнению с гораздо более значительными потерями вследствие портящего действия аэробных микроорганизмов. Проблемы, связанные с гетероферментативными молочнокислыми бактериями, включают, но не ограничиваются ими, их действие на продуктивность животных, а также выявление подходящих штаммов, пригодных для процесса. Различные штаммы даже одних и тех же видов не обладают одинаковыми свойствами и отличаются в отношении их ферментативных характеристик.

Nilson (Arch Microbiol. (1956) 24: 396-411) обнаружили, что преобладающими LAB в силосе являются Streptococci и Lactobacilli, причем наиболее распространенным видом является *L. plantarum*. В работе Gibson et al. (J. Gen. Micro. (1958) 24:60-70) сообщается, что *L. plantarum* и *L. acidophilus* являлись доминирующими компонентами гомоферментативной флоры. Beck {Landwirtschaftliche Forschung. (1972) 27:55-63) показали, что даже в травяном силосе, где над популяцией эпифитов доминировали гетероферментативные LAB, на четвертый день процесса силосования 85% присутствующих организмов были гомоферментативными. Langston et al. (USDA Technical Bulletin № 1187 (1958)) показали, что 69% изолятов из зрелого силоса были гомоферментативными. Иногда в зрелом силосе отмечается сдвиг в сторону гетероферментативных LAB, что обусловлено их способностью переносить низкие pH и высокие концентрации ацетатов. Szigeti (Acta Alimentaria. (1979) 8:25-40) обнаружил, что флора LAB при особо низких pH состояла в основном из *L. plantarum* и *L. brevis*. Grazia и Suzzi (J. Appl. Bacteriol. (1984) 56:373-379) показали, что у гетероферментативных LAB наблюдалась сильная чувствительность к pH 3,6.

Обзор способов силосования и применения микробных препаратов можно найти у Weinberg, ZNG. и Muck, R.E. (1996) FMS Microbiology Rev. 19:53-68, Wilkinson, J.M. и Davies, D.R. (2012) Grass and Forage Science 68:1-19, и Muck, Richard E. (2013) Agricultural and Food Science 22:3-15, раскрытие которых включено в данный документ ссылкой.

В вариантах осуществления настоящего изобретения подавление роста организмов, являющихся причиной порчи, выполняют путем обработки силоса организмами видов *L. buchneri* или *L. brevis*, особенно штаммом(ми) LN7125, LB5328 или LB7123, или композициями, содержащими LN7125, LB5328 или LB7123 или родственные им организмы, а также путем обработки эффективными мутантами или эквивалентами LN7125, LB5328 или LB7123 и содержащими их композициями.

Вариант осуществления данного изобретения представляет собой микробный препарат, содержащий виды *Lactobacillus*, которые изменяют брожение и повышают стабильность силоса, чтобы позволить подвергать его аэробному воздействию на более ранних сроках после начала силосования, чем в существующей практике. В настоящее время в этой индустрии согласно стандартной практике рекомендуется для обработанного микробными препаратами силоса поддерживать анаэробные условия в течение не

менее 30 дней, а предпочтительно 60 дней, чтобы получить максимальную выгоду от микробного препарата с точки зрения сохранения и повышения аэробной стабильности заложенного на хранение зеленого корма. Часто производители не имеют возможности держать свой силос в закрытом состоянии в течение рекомендованного периода(ов) времени из-за индивидуальных ограничений доступного для корма силоса. Вариантом осуществления данного изобретения является обеспечение продолжительности анаэробного брожения в герметично закрытой силосной конструкции, которое составляет менее 30 дней, с использованием штамма *Lactobacillus* в комбинации с кисломолочными бактериями (LAB) или без них. Герметично закрытая силосная конструкция может быть предназначена для проведения анаэробного брожения в течение не менее 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8 или 7 дней.

Вариантом осуществления данного изобретения является биологически чистая культура штамма LN7125 *L. buchneri*, имеющего патентное депонирование № NRRL B-50733, или штамма LB5328 *L. brevis*, имеющего патентное депонирование № NRRL B-50731, или штамма LB7123 *L. brevis*, имеющего патентное депонирование № NRRL B-50732.

Способом вариантов осуществления является способ обработки животного корма или силоса, включающий внесение микробного препарата для силоса, включающий LN7125, LB5328 или LB7123, в корм или силос в количестве от примерно 1×10^3 до 1×10^6 КОЕ/г корма или силоса. Дополнительно другой способ вариантов осуществления представляет собой способ улучшения продуктивности животных, включающий скармливание животному животного корма, в который внесен микробный препарат, как описано в других вариантах осуществления.

Дополнительный вариант осуществления представляет собой микробный препарат для силоса, содержащий жизнеспособные культуры гомоферментативных молочнокислых бактерий и гетероферментативных молочнокислых бактерий, см. пример в патенте США № 6403084. Дополнительные варианты осуществления включают животный корм или силос, содержащий этот микробный препарат для силоса.

Варианты осуществления данного изобретения включают способы обработки силоса путем подавления роста на нем вызывающих порчу организмов, выбранных из дрожжей, плесени и спорообразующих бактерий, которые включают внесение в силос подавляющего рост вызывающих порчу организмов количества композиций вариантов осуществления. Силос, предназначенный для обработки способами данных вариантов осуществления, может быть изготовлен из растений различной природы, включая, но не ограничиваясь этим, травы, кукурузу, люцерну, пшеницу, плевел, зерновые, семена масличных культур, сорго, подсолнечник и ячмень. Композиции вариантов осуществления можно также вносить в силос в ходе хранения. Силос может быть заложен различными путями, включая в виде тюка, мешка, бункера, сборной силосной башни панельной конструкции или штабеля. Способы обработки силоса с использованием композиций данных вариантов осуществления включают внесение в силос сохраняющего качество силоса количества препаратов LN7125, LB5328 или LB7123.

Варианты осуществления данного изобретения дополнительно включают силос, содержащий сохраняющее качество силоса количество LN7125, LB5328 или LB7123 или сохраняющее качество силоса количество его мутанта.

Силос, включенный в варианты осуществления, обеспечивает способы обработки силоса для животного корма с микробным препаратом для силоса по настоящему изобретению, а также обработанный животный корм или сам силос. Часто животный корм или силос будет представлять собой силос из целого растения кукурузы (WPCS) или кукурузы с высоким содержанием влаги (HMC). Варианты осуществления также предоставляют способы улучшения продуктивности животных путем скармливания силоса с внесенным микробным препаратом. Контейнеры, содержащие микробный препарат для силоса по настоящему изобретению, и носитель также включены.

Вариант осуществления изобретения представляет собой способ повышения аэробной стабильности силоса при улучшении усвояемости растительных волокон животными путем скармливания эффективного количества силоса, в который внесен микробный препарат с LN7125, LB5328 или LB7123 в комбинации с производящим ферулат эстеразы бактериальным штаммом или его функциональным мутантом и подходящим носителем. Способы применения таких производящих ферулат эстеразы штаммов раскрыты в патенте США 7799551, включенном в данный документ ссылкой. Штамм ферулата эстеразы может представлять собой, например, штамм *Lactobacillus* или его функциональный мутант, такой как штамм *Lactobacillus*, выбранный из группы, состоящей из *L. buchneri*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. reuteri*, *L. alimentarius*, *L. crispatus* и *L. paralimentarius*. Такие штаммы могут включать, например, выбранные из группы, состоящей из *L. buchneri*, штамм LN4017 (патентное депонирование № РТА-6138), *L. plantarum*, штамм LP678 (патентное депонирование № РТА-6134), *L. plantarum*, штамм LP3710 (патентное депонирование № РТА-6136), *L. plantarum*, штамм LP3779 (патентное депонирование № РТА-6137), *L. plantarum*, штамм LP7109 (патентное депонирование № РТА-6139), *L. brevis*, штамм LB1154 (патентное депонирование № NRRL B-30865), *L. buchneri*, штамм LN4888 (патентное депонирование № NRRL B-30866), *L. reuteri*, штамм LR4933 (патентное депонирование № NRRL B-30867), *L. crispatus* LI2127 (патентное депонирование № NRRL B-30868), *L. crispatus*, штамм LI2350 (патентное депонирование № NRRL B-30869), *L. crispatus*, штамм LI2366 (патентное депонирование № NRRL B-30870), неизвестный вид *Lactobacillus*, штамм

UL3050 (патентное депонирование № NRRL B-30871), и их смеси (см. патент США 7799551). Такая композиция может содержать от примерно 10^1 до примерно 10^{10} жизнеспособных организмов бактериальных штаммов или их функциональных мутантов на грамм засилосованного растительного материала. Необязательно они могут содержать от примерно 10^2 до примерно 10^7 жизнеспособных организмов бактериальных штаммов или их функциональных мутантов, например от примерно 10^3 до примерно 10^6 жизнеспособных организмов бактериальных штаммов или их функциональных мутантов на грамм засилосованного растительного материала.

Композицию, скармливаемую животным, можно обрабатывать эффективным каталитическим количеством бактериального штамма или его функционального мутанта, производящего ферулат эстеразы, как легко может определить специалист в области животноводства. Животные, для которых полезны варианты осуществления настоящего изобретения, представляют собой млекопитающих и птиц, включая, но не ограничиваясь ими, жвачных, лошадей, крупный рогатый скот, свиней, коз, овец и виды птиц, например домашнюю птицу.

Используемые в вариантах осуществления данного изобретения композиции могут быть как жидкой форме, так и в твердой форме, и могут включать дополнительные бактериальные штаммы. В твердых формах для обработки композиция может включать смешанную бактериальную культуру, содержащую LN7125, LB5328 или LB7123 вместе с носителем.

Природа носителя может быть водного или неводного жидкого или твердого происхождения. В твердых формах композиция может включать твердые носители, твердые разбавители или физические наполнители. Примеры таких твердых носителей, твердых разбавителей или физических наполнителей включают мальтодекстрин, крахмалы, карбонат кальция, целлюлозу, молочную сыворотку, перемолотые сердцевинки кукурузных початков и диоксид кремния. Жидкие носители могут представлять собой растворы без ограничения в виде эмульгируемых концентратов, суспензии, эмульсии, в том числе микроэмульсии и/или суспензии, и т.п., которые необязательно можно сгущать в гели. Короче, носитель может быть органическим или неорганическим физическим наполнителем. Твердую композицию можно наносить непосредственно на зеленый корм в виде легкого напыления порошка, или, если он расходуется в жидком носителе, то им можно с успехом опрыскивать зеленый корм.

Специалистам в данной области известны другие подходящие носители и дозируемые формы, или они смогут установить их, используя обычное экспериментирование. Кроме того, введение различных композиций можно выполнять, используя стандартные методики, известные специалистам в данной области.

Другим вариантом осуществления изобретения является комбинация LN7125, LB5328 или LB7123 с другими определенными видами бактерий в соответствующем соотношении, чтобы обеспечить как усиленное брожение, так и улучшить стабилизацию силоса или животного корма, а также улучшенную аэробную стабильность при воздействии воздуха на силос или корм при аэробном воздействии на более ранних сроках. Микробный препарат для силоса может представлять собой выделенную и очищенную комбинацию не менее одного жизнеспособного штамма гомоферментативных молочнокислых бактерий *Lactobacillus plantarum* в сочетании с гетероферментативными бактериями LN7125, LB5328 или LB7123. В некоторых вариантах осуществления микробный препарат для силоса будет включать не менее 2-10 штаммов гомоферментативных и/или гетероферментативных бактерий. Иллюстративные штаммы *L. plantarum* включают не менее одного из LP286, LP287, LP329, LP346, LP347 или их функциональных мутантов (см., например, патент США № 6403084). Иллюстративные штаммы *L. Buchneri*, которые можно комбинировать с LN7125, LB5328 или LB7123, включают LN1391, LN4637, LN4750 или их функциональные мутанты. Микробный препарат для силоса необязательно содержит не менее одного жизнеспособного штамма *Enterococcus faecium*, таких как, но не ограничиваясь ими, штаммы EF301, EF202 или их функциональные мутанты. Число жизнеспособных гомоферментативных бактерий и гетероферментативных бактерий в микробном препарате присутствует в соотношении от примерно 1:5 до примерно 1:15. В некоторых вариантах осуществления соотношение составляет примерно: от 1:6 до 1:14, от 1:7 до 1:13, от 1:8 до 1:12, от 1:9 до 1:11 или 1:10.

Способы применения смешанных культур для улучшения либо брожения, либо аэробной стабильности силоса раскрыты в патенте США № 6403084, который включен в данный документ ссылкой.

Вариантом осуществления данного изобретения является композиция для применения в качестве микробного препарата для силоса, содержащая LN7125, LB5328 или LB7123 или их функциональный мутант и подходящий носитель. В варианте осуществления данного изобретения композиция содержит от примерно 10^1 до примерно 10^{10} жизнеспособных организмов бактериального штамма или его функционального мутанта на грамм засилосованного растительного материала. В дополнительных вариантах осуществления данного изобретения композиция содержит от примерно 10^2 до примерно 10^7 жизнеспособных организмов бактериального штамма или его функционального мутанта на грамм засилосованного растительного материала. В дополнительных вариантах осуществления композиция содержит от примерно 10^3 до примерно 10^6 жизнеспособных организмов бактериального штамма или его функционального мутанта на грамм засилосованного растительного материала.

Материалами, пригодными для силосования или хранения согласно способам данного изобретения,

являются любые материалы, подверженные аэробной порче. Весовая доля сухого вещества в материале обычно составляет не менее 25%. Такие материалы включают, но не ограничиваются этим перечнем, плевел или обычную траву, кукурузу, включая кукурузу с высоким содержанием влаги, целое растение кукурузы, люцерну, пшеницу, бобовые, злаки, семечки масличных культур, сорго, подсолнечник, ячмень или другие злаковые сельскохозяйственные культуры. Ведение хозяйства при хранении силоса включает, но не ограничивается этим, в тюках (эта форма особенно подвержена аэробной порче), мешки с ограниченным притоком кислорода, бункеры, вертикальные сборные силосные башни панельной конструкции, силосные башни с ограниченным притоком кислорода, мешки, штабели или любые другие формы хранения, которые могут быть подвержены аэробной порче.

Активность, представляющую интерес в связи с данным изобретением, можно обнаружить в других штаммах *L. buchneri*, или других видах *Lactobacillus*, например *L. kefir*, *L. parakefir* и *L. parabuchneri*, *L. brevis*, *L. sake*, *L. curvatus*, других видах гомоферментативных кисломолочных бактерий и даже, возможно, что и в других родах. Это можно установить обычным экспериментированием на основе предоставляемой в данном документе информации.

Следует понимать, что в данном контексте термин "штамм" или "штамм(ы)" включает любой мутант или производное различных бактериальных штаммов, раскрываемых в данном документе, например штамм LN7125 *L. buchneri* (патентное депонирование № NRRL B-50733), или штамм LB5328 *L. brevis* (патентное депонирование № NRRL B-50731), или штамм LB7123 *L. brevis* (патентное депонирование № NRRL B-50732), которые сохраняют функциональную активность в отношении улучшения аэробной стабильности зеленых кормов, как описано и определено в способах и примерах, раскрываемых в данном документе.

Микроорганизмы LN7125, LB5328 или LB7123 вариантов осуществления очищали и выделяли из кукурузы или фекалий откармливаемых кукурузой овец. После многих экспериментов путем испытаний была открыта коллекция изолятов.

После очистки и выделения определенного штамма были проведены таксономические исследования с целью идентификации штамма. Он был идентифицирован как *L. buchneri* or *L. brevis* и опытным образцам были присвоены номера LN7125, LB5328 или LB7123. Согласно изобретению этот(и) штамм(ы), композиции, содержащие этот(и) штамм(ы) или факторы, производимые этим(и) штаммом(ми), используются для обработки материалов зеленого корма.

Варианты осуществления настоящего изобретения дополнительно определены в следующих примерах. Следует понимать, что эти примеры, несмотря на то, что они показывают определенные варианты осуществления данного изобретения, приведены только для наглядности. Из вышеприведенного описания и данных примеров специалист в данной области может установить необходимые характеристики этого изобретения и без отступления от его сути и объема может выполнить различные изменения и модификации вариантов осуществления данного изобретения для адаптации его к различным способам применения и условиям. Таким образом, различные модификации вариантов осуществления данного изобретения в дополнение к представленным и описанным в данном документе будут очевидны для специалистов в данной области из вышеизложенного описания. Такие модификации также, как предполагается, находятся в пределах объема прилагаемой формулы изобретения.

Раскрытие каждой ссылки, изложенной в данном документе, включено в данный документ посредством ссылки во всей полноте.

Депонирование

Штамм LN7125 *Lactobacillus buchneri*, штамм LB5328 *Lactobacillus brevis* и штамм LB7123 *Lactobacillus brevis* были депонированы 14 марта 2012г. в коллекции культур the Agricultural Research Service (ARS), размещенной в Microbial Genomics and Bioprocessing Research Unit Национального центра сельскохозяйственного использования исследований (National Center for Agricultural Utilization Research - NCAUR) в соответствии с условиями Будапештского договора. Штамму(ам) был присвоено патентное депонирование № NRRL B-50733, патентное депонирование № NRRL B-50731 и патентное депонирование № NRRL B-50732 соответственно. Адрес NCAUR: 1815 N. University Street, Peoria, IL, 61604. Это(и) депонирование(ия) безоговорочно и без ограничения или других условий будет(ут) общедоступно(ы) после выдачи патента. Однако следует понимать, что доступность депонирования не является разрешением для осуществления заявленного изобретения на практике с ограничением патентных прав, предоставляемых государством.

Заявитель(и) будет(ут) действовать в соответствии со всеми требованиями 1.801-1.809 статьи 37 Кодекса федеральных правил (C.F.R.), в том числе предоставлять отчет о жизнеспособности образца при депонировании. Каждое депонирование будет сохранено без ограничений в депозитории NRRL, который является общедоступным депозитарием, сроком на 30 лет, или 5 лет после самого последнего запроса, или в течение имеющего законную силу времени действия патента в зависимости от того, какой срок является более длинным, и будет замещено, если когда-либо в течение данного периода оно станет нежизнеспособным. Эти депонирования безоговорочно и без ограничения или условий будут общедоступны после выдачи патента. Однако следует понимать, что доступность депонирования не является разрешением для осуществления заявленного изобретения на практике с ограничением патентных прав, пре-

доставляемых государственным регулированием.

Все публикации и заявки на патенты, упомянутые в описании, ориентированы на уровень специалиста в области техники, к которой принадлежит настоящее раскрытие. Все публикации и заявки на патент включены в данный документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация или заявка на патент конкретно и отдельно была включена посредством ссылки.

Хотя в целях ясности понимания вышеприведенное изобретение было довольно подробно описано посредством иллюстрации и примера, очевидно, что на практике можно осуществлять определенные изменения и модификации в пределах объема прилагаемой формулы изобретения.

Примеры

Пример 1. Быстродействующие штаммы *Lactobacillus* для улучшения аэробной стабильности кукурузного силоса.

Были выполнены исследования с целью разработки микробных препаратов, содержащих виды *Lactobacillus*, которые могут улучшать брожение и стабилизацию силоса из целого растения кукурузы, чтобы позволить раннее раскрытие (аэробное воздействие) менее чем через 30 дней после начала силосования.

Выбор штамма.

Гетероферментативные молочнокислые бактериальные культуры (252 изолятов), отобранные из коллекции микробных культур Pioneer Hi-Bred, выращивали в бульоне De Man Rogosa Sharpe (бульон MRS; Difco™ *Lactobacilli* MRS; Becton Dickinson and Company, Sparks, MD 21152 USA), приготовленном согласно инструкции производителя, в течение периода от 24 до 48 ч. Аликвоту клеточной суспензии переносили в бульон из экстракта из зеленого корма на основе целого растения кукурузы (смесь 1:10 сухого перемолотого кукурузного корма в воде, обработанная в автоклаве, стерилизованная фильтрованием через 0,2 микронный фильтр, затем добавляли 0,5% глюкозы) и выращивали 40 ч при 37°C.

После первоначального скрининга было отобрано пять изолятов для исследования в полевых условиях в 2011 г., чтобы установить их способность к усилению аэробной стабильности силосованного зеленого корма из целого растения кукурузы. Штаммы обнаружили и идентифицировали из образцов кукурузы или из фекалий откармливаемых кукурузой овец, взятых в Соединенных Штатах. В 2012 г. эксперимент с тремя из этих изолятов повторяли на целом растении кукурузы и на комбинации с коммерческими гомоферментативными штаммами LP286 и LP329.

Характеристики исследуемых штаммов:

Штамм	ID вида по 16S рДНК	Источник	Образование газа в MRS
LB7123	<i>Lactobacillus brevis</i>	Фекалии овец, откормленных на WPCS, Полк Сити, Айова, 2008г.	газ положителен
LB4616	<i>Lactobacillus brevis</i>	НМС, Центр Далласа, 1997г.	газ положителен
LB5328	<i>Lactobacillus brevis</i>	WPCS, Айова, 1995г.	газ положителен
LB31	<i>Lactobacillus brevis</i>	WPCS, Керси, Колорадо, 1993г.	газ положителен
LN7125	<i>Lactobacillus buchneri</i>	WPCS, Полк Сити, Айова, 2008г.	газ положителен

Полевые испытания.

Кукуруза урожая 2011г. Три гибрида (P1162, 33M16, DeKalb 61669vt3) зеленого корма из целого растения кукурузы выращивали и убирали отдельно 1 сентября 2011г. в Центре питания домашнего скота в Шелдале, Айова, с содержанием сухого вещества 33-37%.

Кукуруза урожая 2012г. Три гибрида (P90115XR, P1162XR, P1395XR) зеленого корма из целого растения кукурузы выращивали и убирали отдельно 21 сентября 2011г. в Центре питания домашнего скота в Шелдале, Айова, с содержанием сухого вещества 33-37%.

Обработки кукурузного силоса 2011г.

Коммерческие микробные препараты марки Pioneer® для целого растения кукурузы
11A44
1132
11C33
11CFT

Экспериментальные исследуемые штаммы
LB31
LB4616
LB5328
LB7123
LN7125

Обработки кукурузного силоса 2012г.

Коммерческие микробные препараты марки Pioneer® для целого растения кукурузы
11A44
1132
11C33
11CFT

Экспериментальные штаммы для испытаний и комбинации
LB5328
LB7123
LN7125
LB5328+LP286+LP329
LB7123+LP286+LP329
LN7125+LP286+LP329

Внесение микробного препарата.

В 2011г. индивидуальные экспериментальные штаммы для испытаний выращивали и поставляли в виде свежевывращенной культуры. В 2012г. индивидуальные экспериментальные штаммы для испытаний выращивали, лиофилизировали на месте и поставляли в виде сухой порошкообразной культуры. Коммерческие и экспериментальные лиофилизированные продукты суспендировали в воде, затем все обработки приводили к стандартной концентрации, равной $4,54 \times 10^7$. Суспензии для обработки применяли, используя 10 см^3 шприц с расходом 1,0 мл/фунт зеленого корма. Внесенная доза для всех обработок составляла 1×10^5 КОЕ/г зеленого корма.

Силос.

Силосные хранилища из PVC заполняли 160 кг СВ/м^3 зеленого корма из целого растения кукурузы и насыщали воздухом 24 ч, как описано ниже в зависимости от дней раскрывания.

День раскрывания хранилища силоса	24 ч насыщения воздухом День
7	0
14	7
28	14
60	45

Аэробная стабильность.

Способ по Honig (Proc. Of the Eurobac. Conf., P. Lingvall и S. Lindgren (ed.) (12-16 Август 1986) Swed. Univ. of Agric. Sci. Grass and Forage Report No. 3-1990. Pp. 76-81. Uppsala, Sweden.) использовали для измерения аэробной стабильности. Аэробные потери сухого вещества (ПСВ) оценивали по повышению температуры после воздействия воздуха, как описано у Honig.

Результаты и обсуждение.

Аэробная стабильность.

Обработки гетероферментативными лактобактериями снижают потери сухого вещества и увеличивают время до разогрева. Наблюдали различия между штаммами, возникающие с течением времени.

2011 г. Кукурузный силос (табл. 1).

Раскрывание в день 7 и 14 приводит к статистически значимым различиям между обработками с использованием LB5328, LB7123 и LN7125 и необработанным препаратом контрольным силосом, которые продержались до дня 60, когда наблюдались многочисленные эффекты.

Обработки с использованием LB5328, LB7123 и LN7125 также приводили к статистически значимому улучшению по сравнению с имеющимися коммерческими микробными препаратами (11A44, 11C33 и 11CFT) при оценке их действия в ходе ранних раскрываний. Эти три штамма демонстрируют

значительное улучшение по сравнению с другими отобранными гетероферментативными штаммами (LB31 и LB4616).

Два *Lactobacillus brevis* (LB7123 & LB5328) и один *Lactobacillus buchneri* (LN7125), отобранные в этих испытаниях, эффективно улучшали аэробную стабильность силоса из целого растения кукурузы, если его раскрывали до наступления 30 дня (на 7 и 14 день). Были отмечены очевидные отличия от контрольных и менее эффективных штаммов. Три штамма включили в последующие испытания на силосе из целого растения кукурузы 2012г. при индивидуальном применении и применении в комбинации с существующими коммерческими гомоферментативными штаммами LP286 и LP329.

2012 г. Кукурузный силос (табл. 2).

Раскрывание на 7 и 14 день обработок приводило к биологическим и статистически значимым различиям между одним штаммом LB7123 и контрольным силосом без микробного препарата. Различия на 28 и 60 день были лучше численно, но не статистически, для LB7123 по сравнению с контролем.

Наблюдали продолжающуюся тенденцию в случае комбинированных обработок с использованием LB5328+, LB7123+ и LN7125+ с положительным ответом на 7 и 14 день. Открывание на 7 день привело к численному улучшению в отношении аэробных ПСВ по сравнению с контролем, в то время как комбинированные обработки были значительно лучше, чем контрольные на 14 день. Все три комбинированные обработки устойчиво демонстрировали улучшение (на 30-40%) по сравнению с контрольными. Сходное снижение аэробных потерь сухого вещества наблюдали с 11A44 и 11CFT.

Активного улучшения ПСВ на 7, 14 или 28 день при использовании коммерческих продуктов отмечено не было, однако 11A44 и 11CFT оказали положительное действие на аэробную стабильность на 60 день, как наблюдалось в предыдущих исследовательских испытаниях.

2011 и 2012 гг. Комбинированные исследования на кукурузном силосе (табл. 3).

В общем случае эффективность обработок одним штаммом LB5328, LB7123 и LN7125 в течение двух лет испытаний на силосе из целого растения кукурузы (6 исследований, 24 силос/tmt (tmt - время до достижения максимальной температуры)) была устойчивой в отношении снижения аэробной потери сухого вещества по сравнению с контрольным силосом без микробного препарата и существующими коммерческими продуктами при открываниях до наступления 28 дня.

Обработки LB7123 и LN7125 были статистически лучше контрольных и коммерческих обработок на 7 и 14 день. LN7123, LN7125 и LN7125 также продемонстрировали статистически значимые различия от контрольных к 14 дню. На 28 и 60 дни эти три одиночных штамма были численно лучше контрольных и продемонстрировали аэробную стабильность, эквивалентную коммерческим продуктам 11A44, 11C33 и 11CFT.

Вывод.

Благодаря снижению аэробных потерь сухого вещества, обеспечиваемого этими штаммами и комбинациями с гомоферментативными бактериями, наблюдали устойчивые повторяющиеся улучшения в отношении потерь сухого вещества при ранних раскрываниях засилосованных зеленых кормов из целого растения, предоставляя экономическое преимущество производителю при использовании специально отобранных микробных препаратов *L. buchneri* или *L. brevis*.

Таблица 1. Влияние *Lactobacillus buchneri* и *Lactobacillus brevis* на потери сухого вещества под воздействием воздуха в силосе из целого растения кукурузы, силосованного в течение различных периодов времени

2011	ПСВ - дни после начала силосования			
	7	14	28	60
Контроль	3,36 ^a	5,73 ^a	4,93 ^a	4,37 ^{ab}
1132	2,74 ^a	5,22 ^a	2,91 ^{bc}	5,77 ^a
11A44	3,71 ^a	5,76 ^a	3,19 ^{abc}	5,39 ^{ab}
11C33	2,99 ^a	5,39 ^a	4,26 ^{ab}	4,57 ^{ab}
11CFT	2,29 ^{ab}	4,75 ^{ab}	3,14 ^{abc}	4,39 ^{ab}
LB31	2,09 ^{abc}	5,41 ^a	3,52 ^{abc}	5,09 ^{ab}
LB4616	2,12 ^{abc}	4,41 ^{abc}	3,17 ^{abc}	5,04 ^{ab}
LB5328	1,95 ^{abc}	3,23 ^{bc}	2,40 ^c	3,88 ^{ab}
LB7123	0,94 ^{bc}	3,32 ^{bc}	2,67 ^{bc}	3,95 ^b
LN7125	0,51 ^{bc}	2,99 ^c	2,14 ^c	3,95 ^b

Таблица 2. Влияние *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus brevis* и комбинаций с гомоферментативными бактериями на потери сухого вещества под воздействием воздуха в силосе из целого растения кукурузы, силосованного в течение различных периодов времени

2012	ПСВ - дни после начала силосования			
	7	14	28	60
Контроль	2,91 ^{ab}	4,66 ^a	2,90 ^b	2,95 ^a
1132	2,94 ^{ab}	4,17 ^{ab}	2,97 ^b	2,35 ^{ab}
11A44	3,60 ^a	3,60 ^{abcd}	2,95 ^b	1,03 ^b
11C33	2,99 ^{ab}	3,89 ^{abc}	4,09 ^{ab}	2,70 ^a
11CFT	3,46 ^a	4,45 ^a	4,72 ^a	1,55 ^{ab}
LB5328	2,91 ^{ab}	3,37 ^{abcd}	3,89 ^{ab}	2,39 ^{ab}
LB7123	0,95 ^c	2,54 ^{de}	2,77 ^b	2,52 ^a
LN7125	2,20 ^b	3,39 ^{abcd}	3,32 ^{ab}	2,28 ^{ab}
LB5328+LP286+LP329	2,76 ^{ab}	2,80 ^{bcde}	2,82 ^b	2,02 ^{ab}
LB7123+LP286+LP329	2,20 ^b	1,85 ^e	3,31 ^{ab}	1,86 ^{ab}
LN7125+LP286+LP329	2,03 ^{bc}	2,70 ^{cde}	2,50 ^b	1,74 ^{ab}

Таблица 3. Влияние *Lactobacillus buchneri* и *Lactobacillus brevis* на потери сухого вещества под воздействием воздуха в силосе из целого растения кукурузы, силосованного в течение различных периодов времени

Объединенные 2011 и 2012 гг.	ПСВ - дни после начала силосования			
	7	14	28	60
Контроль	3,10 ^{ab}	5,02 ^a	3,77 ^{ab}	3,66 ^a
11A44	3,76 ^a	4,72 ^a	2,98 ^{ab}	3,31 ^a
11C33	2,99 ^{ab}	4,67 ^a	4,17 ^a	3,63 ^a
11CFT	2,87 ^{ab}	4,44 ^{ab}	3,77 ^{ab}	3,03 ^a
LB5328	2,43 ^b	3,56 ^{bc}	3,00 ^{ab}	3,66 ^a
LB7123	0,94 ^c	2,82 ^c	2,72 ^b	3,20 ^a
LN7125	1,35 ^c	3,08 ^c	2,64 ^b	3,33 ^a

Пример 2. Быстродействующие штаммы *Lactobacillus* для улучшения аэробной стабильности травяного силоса.

Выбор штамма.

Гетероферментативные молочнокислые бактериальные культуры (252 изолятов), отобранные из коллекции микробных культур Pioneer Hi-Bred's, выращивали в бульоне De Man Rogosa Sharpe (бульон MRS; Difco™ *Lactobacilli* MRS; Becton Dickinson and Company, Sparks, MD 21152 USA), приготовленном согласно инструкции производителя, в течение периода от 24 до 48 ч.

Аликвоту клеточной суспензии переносили в бульон из экстракта из зеленого корма на основе целого растения кукурузы (смесь 1:10 сухого перемолотого кукурузного корма в воде, обработанная в автоклаве, стерилизованная фильтрованием через 0,2 микронный фильтр, затем добавляли 0,5% глюкозы) и выращивали 40 ч при 37°C.

Штаммы обнаружили и идентифицировали из образцов кукурузы или из фекалий откармливаемых кукурузой овец, взятых в Соединенных Штатах. В 2012г. на европейском плевеле были испытаны три изолята, а в 2013г. были испытаны только два изолята в виде одного штамма и в комбинации с существующими коммерческими гомоферментативными штаммами LP286 и LP329.

Характеристики экспериментальных штаммов для испытаний.

Штамм	ID вида по 16S рДНК	Источник	Образование газа в MRS
LB7123	Lactobacillus brevis	Фекалии овец, откормленных на WPCS, Полк Сити, Айова, 2008г.	газ положителен
LB5328	Lactobacillus brevis	WPCS, Айова, 1995г.	газ положителен
LN7125	Lactobacillus buchneri	WPCS, Полк Сити, Айова, 2008г.	газ положителен

Полевые испытания:

Травы урожая 2012г.. Европейский плевел, собранный в районе Букстехуде, Германия, 22, 23 и 24 мая 2012 г. и имеющий содержание сухого вещества 33-49%.

Травы урожая 2013 г.. Европейский плевел, собранный в районе Букстехуде, Германия, 3, 4 и 6 июня 2013г. и имеющий содержание сухого вещества 36-46%.

Обработки силоса из европейского плевела 2012г.

Коммерческие микробные препараты марки Pioneer® для трав	Экспериментальные исследуемые штаммы
11A44	LB5328
11G22	LB7123
11GFT	LN7125

Обработки силоса из европейского плевела 2013г.

Коммерческие микробные препараты марки Pioneer® для целого растения кукурузы	Экспериментальные штаммы для испытаний и комбинации
11A44	LB7123
11GFT	LN7125
	LB7123+LP286+LP329
	LN7125+LP286+LP329

Внесение микробного препарата.

В 2012 и 2013гг. индивидуальные экспериментальные штаммы для испытаний выращивали, лиофилизировали на месте и поставляли в виде сухой порошкообразной культуры. Коммерческие и экспериментальные лиофилизированные продукты суспендировали в воде, затем все обработки приводили к стандартной концентрации, равной $4,54 \times 10^7$. Суспензии для обработки применяли, используя 10 см³ шприц с расходом 1,0 мл/фунт зеленого корма. Внесенная доза для всех обработок составляла 1×10^5 КОЕ/г зеленого корма.

Силос.

Силосные хранилища из PVC заполняли 100 кг СВ/м³ травы и насыщали воздухом 24 ч, как описано ниже в зависимости от дней раскрывания.

День раскрывания хранилища силоса	24 ч насыщения воздухом День
7	0
14	7
28	14
60	45

Аэробная стабильность.

Способ по Honig (Proc. Of the Eurobac. Conf., P. Lingvall и S. Lindgren (ed.) (12-16 Август 1986) Swed. Univ. of Agric. Sci. Grass and Forage Report No. 3-1990. Pp. 76-81. Uppsala, Sweden.) использовали для измерения аэробной стабильности. Аэробные потери сухого вещества (ПСВ) оценивали по повышению температуры после воздействия воздуха, как описано у Honig.

Результаты и обсуждение.

Аэробная стабильность.

Обработки гетероферментативными лактобактериями снижали потери сухого вещества и увеличивали время до разогрева. Наблюдала различия между штаммами, возникающие с течением времени.

2012 г. Травяной силос (табл. 1).

Раскрывание травяного силоса на 14, 28 и 60 день приводило к различиям между обработками одним штаммом LB5328, LB7123 и LN7125 и контрольным силосом без микробного препарата. Эти три обработки на 7, 14 и 28 день были численно лучше, чем контрольные и коммерческие продукты.

Улучшения аэробного ПСВ на 7 или 14 день при использовании коммерческих продуктов отмечено не было, однако к 28 дню 11A44 и 11G22 показали значительное улучшение по сравнению с контролем. К 60 дню все обработки за исключением 11GFT показали значительное улучшение по сравнению с контролем.

2013 г. Травяной силос (табл. 2).

Обработки одним штаммом LN7125 и LB7123 привели к значительному снижению аэробной потери сухого вещества по сравнению с контрольной без микробного препарата по всем исследованным дням раскрывания. Комбинация штаммов LB7123 и *L. plantarum* эффективно снижала аэробные потери сухого вещества по всем дням, в то время как комбинация *L. plantarum* с LN7125 не показала статистического различия с контролем без микробного препарата.

Коммерческие продукты незначительно влияли на аэробную потерю сухого вещества вплоть до 90 дня после начала силосования. Обработка 11A44 была более эффективной в отношении снижения потерь сухого вещества, чем комбинированный продукт 11G22.

Вывод.

Благодаря снижению аэробных потерь сухого вещества, обеспечиваемого этими штаммами и комбинациями с гомоферментативными бактериями, наблюдали устойчивые повторяющиеся улучшения в отношении потерь сухого вещества при ранних раскрываниях засилосованных травяных зеленых кормов, предоставляя экономическое преимущество производителю при использовании специально отобранных микробных препаратов *L. buchneri* или *L. brevis*.

Таблица 1. 2012 г. Влияние *Lactobacillus buchneri* и *Lactobacillus brevis* на потери сухого вещества под воздействием воздуха в силосе из европейских трав, силосованного в течение различных периодов времени

2012 г. - Европейские травы	ПСВ - дни после начала силосования			
	7	14	28	60
Контроль	2,76 ^{ab}	7,10 ^a	6,5 ^a	3,30 ^a
11A44	2,27 ^{abc}	4,3 ^{ab}	2,72 ^b	1,18 ^b
11G22	3,25 ^a	6,35 ^a	2,31 ^b	0,00 ^b
11GFT	2,5 ^{ab}	6,05 ^a	6,07 ^a	3,42 ^a
LB5328	1,68 ^{abc}	2,41 ^b	2,72 ^b	0,77 ^b
LB7123	0,29 ^c	2,47 ^b	1,58 ^b	0,01 ^b
LN7125	0,75 ^{bc}	2,34 ^b	2,02 ^b	0,11 ^b

^{abc} в пределах дня, значения с различными приставками различаются с $p \leq 0,05$

Таблица 2. 2013 г. Влияние одних *Lactobacillus buchneri* и *Lactobacillus brevis* и в комбинации с *Lactobacillus plantarum* на потери сухого вещества под воздействием воздуха в силосе из европейских трав, силосованного в течение различных периодов времени ПСВ - дни после начала

2013 г. - Европейские	силосования			
травы	7	14	28	90
Контроль	7,11 ^a	6,46 ^{ab}	6,08 ^{ab}	1,77 ^a
11A44	3,54 ^{abc}	2,63 ^{bcd}	0,22 ^c	0,10 ^a

11GFT	5,77 ^{ab}	7,56 ^a	7,44 ^a	1,46 ^a
LB7123	0,00 ^c	0,23 ^d	0,00 ^c	0,00 ^a
LN7125	1,25 ^{ab}	1,35 ^{cd}	0,11 ^c	0,00 ^a
LN7125+LP286+LP329	6,18 ^a	5,24 ^{abc}	3,52 ^{bc}	0,17 ^a
LB7123+LP286+LP329 ^{abcd}	0,44 ^c	1,08 ^{cd}	2,58 ^{bc}	0,46 ^a

в пределах дня, значения с различными приставками различаются с $p \leq 0,05$

После демонстрации и описания принципов вариантов осуществления настоящего изобретения специалисту в данной области должно быть понятно, что варианты осуществления данного изобретения могут быть изменены в отношении из проведения и деталей, выходя за рамки указанных принципов. Так, данное изобретение включает все альтернативные варианты осуществления, которые охвачены, непосредственно или эквивалентно, объемом этой формулы изобретения.

Следует понимать, что различные предпочтительные варианты осуществления показаны и описаны выше для иллюстрирования различных возможных признаков изобретения и разнообразных путей комбинирования этих признаков. Кроме разнообразных путей комбинирования различных признаков приведенных выше вариантов осуществления, объемом данного изобретения также предусмотрены другие модификации.

Все публикации и опубликованные патентные документы, цитированные в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки в той же степени, как если бы было специально и отдельно указано, что каждая отдельная публикация или публикация патентного документа включена посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, используемая в качестве инокулянта для силосования, содержащая штамм LN7125 *Lactobacillus buchneri* № NRRL B-50733, или штамм LB5328 *Lactobacillus brevis* № NRRL B-50731, или штамм LB7123 *Lactobacillus brevis* № NRRL B50732, или их смеси и подходящий носитель.

2. Композиция по п.1, где композиция содержит:

(a) от примерно 10^1 до примерно 10^{11} жизнеспособных микроорганизмов на грамм влажного веса силоса;

(b) от примерно 10^2 до примерно 10^7 жизнеспособных микроорганизмов на грамм влажного веса силоса; или

(c) от примерно 10^3 до примерно 10^6 жизнеспособных микроорганизмов на грамм влажного веса силоса.

3. Композиция по п.1, где носитель представляет собой жидкость или твердое вещество.

4. Композиция по п.1, где носитель представляет собой:

(a) карбонат кальция, или

(b) крахмал, или

(c) целлюлозу.

5. Штамм LN7125 *Lactobacillus buchneri* № NRRL B-50733, используемый в качестве инокулянта для силосования.

6. Штамм LB5328 *Lactobacillus brevis*, имеющий патентное депонирование № NRRL B-50731, используемый в качестве инокулянта для силосования.

7. Штамм LB7123 *Lactobacillus brevis* № NRRL B50732, используемый в качестве инокулянта для силосования.

8. Способ силосования растительного материала, включающий внесение в указанный материал композиции по п.1.

9. Способ по п.8, где растительный материал выбран из травы, кукурузы, люцерны, пшеницы, бобовых, семечек масличных культур или сорго.

10. Способ по п.8, который включает хранение растительного материала в течение:

(a) двадцати девяти (29) дней;

(b) двадцати восьми (28) дней;

(c) четырнадцати (14) дней или

(d) семи (7) дней

после внесения композиции по п.1 в указанный растительный материал.

11. Способ по п.8, выбранный из:

a) силосования в рулонах;

b) силосования в тюках;

c) силосования в бункере;

d) силосования в штабеле;

e) силосования в сборной силосной башне панельной конструкции и

f) силосования в силосной башне.

12. Способ по п.8, который дополнительно включает внесение в растительный материал гомоферментативных молочнокислых бактерий.

