

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202090866** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2020.08.17

(51) Int. Cl. *C12N 1/20* (2006.01)
A23K 30/18 (2016.01)
C12R 1/225 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.09.28

(54) **ШТАММЫ МИКРООРГАНИЗМОВ LACTOBACILLUS BUCHNERI BIOCC 203 DSM 32650 И LACTOBACILLUS BUCHNERI BIOCC 228 DSM 32651 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) P201700033; P201800024

(32) 2017.09.28; 2018.09.27

(33) EE

(86) PCT/EE2018/000003

(87) WO 2019/063056 2019.04.04

(71) Заявитель:

ТОО БИОСС (EE)

(72) Изобретатель:

Сонгисепп Эпп, Герулис Оксана,
Садам Лиина, Куузик Сирье, Мурувез
Мерле, Наппа Анетте (EE)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение обеспечивает изолированные штаммы микроорганизмов *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 и *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 и их применение в качестве микробиологических пищевых добавок. Штаммы используют в целях обеспечения аэробной стабильности корма с низким содержанием сухого вещества ($\leq 20\%$) и улучшения брожения корма для увеличения концентрации молочной и уксусной кислот в корме и для снижения уровня pH, следовательно, сокращения потерь питательных веществ в корме. Применение микроорганизмов в процессе силосования подавляет действие патогенных микроорганизмов (энтеропатогенных) и дрожжевых грибков в корме. Штаммы могут применяться для продления срока хранения корма, приготовленного из свежего трудноображиваемого материала.

A1

202090866

202090866

A1

ШТАММЫ МИКРООРГАНИЗМОВ *LACTOBACILLUS BUCHNERI* ВЮСС 203 DSM
32650 И *LACTOBACILLUS BUCHNERI* ВЮСС 228 DSM 32651, И ИХ
ПРИМЕНЕНИЕ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Изобретение относится к области биотехнологии и применяется для производства корма для животных. Изобретение относится к микробиологической силосной добавке и её применению в сбраживании корма в целях обеспечения аэробной стабильности, повышения качества брожения корма.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Содержание питательных веществ в силосе необходимо сохранять от уборки урожая и хранения корма до потребления корма животными.

Силос представляет собой материал, полученный путем контролируемого брожения сельскохозяйственной культуры с высоким содержанием влаги (McDonald, P., Henderson, A. R., Heron, S.J.E. 1991. The biochemistry of silage. 2nd ed. Chalcombe Publications, Marlow, Bucks UK, стр. 340).

Силосование представляет собой способ консервирования растительного корма для животных, который основан на молочнокислом брожении в анаэробных условиях (Rooke, J., A. and Hatfield, G., D., 2003. Biochemistry of Ensiling. In: Silage Science and Technology. D. R. Buxton, R. E. Muck, and J. H. Harrison, eds. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA. стр. 95-139). Сбраживание силоса может быть разделено на четыре стадии: (1) анаэробная стадия в хранилище для силоса после сбора урожая, (2) стадия брожения, (3) стадия стабильного хранения и (4) стадия выгрузки силоса, когда хранилище для силоса открыто и силос подвергается воздействию воздуха. Для получения высококачественного силоса, подлежащий силосованию материал должен подвергаться правильному микробному брожению. Успешное брожение также зависит от вида и качества травянистых растений, техник, используемых в процессе силосования, климата, развития нежелательных микроорганизмов (например, клостридий,

энтеропатогенных микробов, листерий, бацилл) и грибков (дрожжевых и плесневых), а также содержание сухого вещества в материале, подлежащего сбраживанию.

Естественное брожение корма трудно контролировать, поскольку брожение силоса представляет собой сложное сочетание нескольких различных химических и микробиологических процессов и их взаимодействий.

Большую часть силоса изготавливают с содержанием сухого вещества 200–500 г/кг. При таком уровне многие ферменты растительного происхождения активны в ходе процесса силосования, а многие желательные и нежелательные микроорганизмы, дрожжевые и плесневые грибки могут расти в силосе при таких условиях. Таким образом, получение контроля над всей биологической активностью представляет собой серьезный вызов и может быть достигнуто только посредством хорошо управляемого процесса силосования (Muck, R. E. 2010. Silage microbiology and its control through additives. R. Bras. Zootec. Vol. 39. Июль).

В контролируемом процессе силосования водорастворимые углеводы сбраживаются молочнокислыми бактериями до молочной кислоты. В результате уровень pH сбраживаемого материала падает (сбраживаемая масса подкисляется), что в свою очередь подавляет активность микроорганизмов, вызывающих порчу (Oude Elferink, S. J. W. H., Driehuis, F., Gottschal, J. C, Spoelstra, S. F. 2000. Silage fermentation processes and their manipulation. - Journal FAO Plant Production and Protection No 161, стр. 17-30). Чем быстрее кислотность силоса падает до pH 4, тем быстрее прекращается ферментативная и микробная активность, корм становится стабильным и сохраняется больше питательных веществ.

Сообщалось, что качество брожения силоса можно существенно улучшить с помощью добавок, содержащих молочнокислые бактерии (McDonald, P., Henderson, A. R., Heron, S.J.E. 1991. The biochemistry of silage. 2nd ed. Chalcombe Publications, Marlow, Bucks UK, стр. 340).

Таким же важным, как и сохранение питательных веществ при брожении и на стадии хранения силоса является сохранение питательных

веществ в силосе при открывании хранилища для силоса. Силос может подвергаться воздействию кислорода и тогда, когда хранилище для силоса открыто для подачи, а также в результате недостаточного покрытия хранилища для силоса.

Любой силос, подвергающийся воздействию воздуха, рано или поздно портится в силу активности аэробных микроорганизмов. Аэробная стабильность силоса также зависит от силосной культуры, подвергаемой силосованию, стадии её роста во время сбора урожая, биохимических и микробиологических факторов брожения, физических характеристик силосного материала, организации управления силосованием, температуры и выбора силосной добавки. Показателем аэробной стабильности силоса является промежуток времени, когда силос устойчив к процессам аэробной порчи, т.е. промежуток времени, когда он сохраняет свое качество при контакте с воздухом. Аэробная стабильность силоса оценивается на основе скорости, с которой растёт температура силоса. Чем дольше температура силоса остается стабильной, т.е. чем дольше она не растёт выше температуры окружающей среды более чем на 3°C (Commission Regulation (EC) No. 429/2008; DLG- Richtlinienfiir die Prufung von Siliermitteln auf DLG- Gutezeichen-Fahigkeit, DLG Октябрь 2013), тем выше аэробная стабильность и качество силоса. В большинстве силосов, подверженных порче в аэробных условиях, температура поднимается выше температуры окружающей среды под действием микробного окисления кислот и водорастворимых углеводов до диоксида углерода и воды.

Несмотря на то, что низкий уровень pH силоса подавляет рост нежелательных микроорганизмов в анаэробных условиях, одного низкого pH не достаточно для предотвращения аэробной порчи. Порча силоса в аэробных условиях обычно начинается с дрожжевых грибков, которые могут расти даже при относительно низких уровнях pH. Дрожжевые грибки могут расти в широком диапазоне pH (pH 3–8). Оптимальным для роста большинства дрожжевых грибков является pH равный 3,5–6,5. Когда силос подвергается воздействию воздуха во время открывания хранилища для силоса, кислоты и другие

компоненты, которые образовались в ходе брожения, окисляются аэробными бактериями, дрожжевыми и плесневыми грибами. В результате активности дрожжевых грибов выделяется диоксид углерода, который нагревает силос, что в свою очередь является непосредственной причиной потери сухого вещества (McDonald, P., Henderson, A. R., Heron, S.J.E. 1991. The biochemistry of silage. 2nd ed. Chalcombe Publications, Marlow, Bucks UK, стр. 340).

Дрожжевые грибки используют остаточный сахар, содержащийся в силосе, в качестве источника энергии, однако, молочную кислоту в первую очередь. В результате этого хорошо сброженные силосы с высоким содержанием молочной кислоты особенно подвержены аэробной порче. Активность дрожжевых грибов вызывает повышение уровня pH силоса, давая возможность другим аэробным микроорганизмам и плесневым грибкам стать активными. Высокая микробная активность в хорошо сброженном питательном силосе обнаруживается благодаря увеличению температуры силоса.

Сообщалось (Ohyama, Y., Hara, S. and Masaki, S. (1980) Analysis of the factors affecting aerobic deterioration of grass silages. In Thomas, C. (ed.) Forage conservation in the 80s. BGS Occasional Symposium No. 11, стр. 257-261. Reading, UK: British Grassland Society), что содержание сухого вещества, уксусной и пропионовой кислоты и количество дрожжевых и плесневых грибов в силосе при открытии хранилища для силоса, являются важными определяющими факторами аэробной стабильности силоса. Отрицательная корреляция относительно содержания сухого вещества и дрожжевых грибов показала, что более высокие значения были связаны с более короткими интервалами времени на увеличение температуры силоса на воздухе. С другой стороны, что касается уксусной и масляной кислоты, более высокая концентрация данных продуктов брожения была связана с более стабильными силосами.

Как отмечалось, низкий уровень pH силоса не оказывает прямого воздействия на микроорганизмы, которые вызывают аэробную порчу; однако кислоты, образовавшиеся в ходе брожения силоса, имеют

переменное значение. Рост дрожжевых грибов ингибируется недиссоциированными короткоцепочечными жирными кислотами (Pahlow G., Muck R.E., Driehuis F., Oude Elferink S.J.W.H. and Spoelstra S.F. (2003) Microbiology of ensiling. In: Buxton D.R., Muck R.E. and Harrison J.H. (eds) Silage science and technology, pp. 31-93. Madison, WI, USA: Agronomy Publication No. 42, American Society of Agronomy). Молекулы недиссоциированных кислот могут проникать в клеточную мембрану микроба посредством пассивной диффузии, что приводит к высвобождению ионов H^+ . Это снижает уровень pH внутри клетки, вызывая ее гибель. Скорость диссоциации кислоты в силосе зависит от константы диссоциации кислоты (pKa) и уровня pH силоса (Zirchrom (2011) Dissociation constants of organic acids and bases. Доступна: <http://www.zirchrom.com/organic.htm> (по состоянию на 3 ноября 2011)). Уксусная и пропионовая кислоты менее склонны к диссоциации, чем молочная кислота, что объясняет восприимчивость хорошо сброженного силоса с высоким содержанием молочной кислоты к аэробной порче. С другой стороны, уксусная и пропионовая кислоты эффективно ингибируют рост дрожжевых и плесневых грибов. Масляная кислота действует аналогично. Силос с высоким содержанием масляной кислоты обладает хорошей аэробной стабильностью, однако, это указывает на активность кластридий, вызывающих порчу. Такой силос характеризуется существенными потерями питательных веществ и высоким содержанием масляной кислоты, что может вызывать у животных проблемы со здоровьем. Содержание пропионовой кислоты в силосе редко и мало; концентрация продуцирующих её микроорганизмов в силосных культурах мала, и их конкурентоспособность низкая.

Содержание уксусной кислоты в силосе является показателем гетероферментации; поскольку уксусная кислота является высокотоксичной по отношению к дрожжевым грибкам, такие силосы обычно демонстрируют превосходную аэробную стабильность.

Идеальное брожение силоса снижает потери при брожении и обеспечивает достаточную стабильность в ходе хранения корма и его выгрузки из хранилища для силоса для скармливания. Эффективная

силосная добавка, правильная организация производства и правильное использование силоса играют ключевую роль в достижении данных целей. Большинство силосных добавок было разработано для улучшения процесса силосования и питательной ценности силосованного корма. Однако в дополнение к обеспечению быстрого брожения и повышению качества силоса, также ожидается, что силосные добавки ингибируют рост организмов, вызывающих порчу (включая аэробную порчу). Основной причиной использования силосной добавки в целях повышения аэробной стабильности силоса является предотвращение нагревания силоса, потери питательных веществ и снижения продуктивности животных из-за употребления испорченного силоса.

В силосных добавках часто используются ферменты; однако они не ингибируют дрожжевые и плесневые грибки, что означает, что силосы, приготовленные с ферментами, обладают очень небольшой аэробной стабильностью.

Органические кислоты, такие как пропионовая, уксусная и бензойная, эффективны для повышения аэробной стабильности силоса. Их добавляют или в больших количествах для достижения, так называемой конечной консервации корма, или в меньших количествах. В последнем случае ингибируется активность дрожжевых грибков, но не гарантируется полное консервирование корма и силосование продолжает зависеть от естественного брожения. Также сообщалось, что аммиак оказывает ингибирующее действие на бактерии, дрожжевые и плесневые грибки. К сожалению, органические кислоты и другие химические соединения агрессивны и повреждают силосное оборудование; к обращению с ними и их хранению предъявляются строгие требования безопасности.

Биологические силосные добавки на основе молочнокислых бактерий считаются натуральными продуктами; их преимущества включают их отсутствие токсичности, они не вызывают коррозию оборудования, отсутствие рисков для окружающей среды.

Цель снижения уровня pH силоса при помощи молочнокислых бактерий состоит в минимизации потерь при брожении. Молочнокислые бактерии

подразделяют на две группы на основе брожения глюкозы: гомоферментативные и гетероферментативные виды. Гомоферментативные молочнокислые бактерии из одного моля глюкозы продуцируют два моля молочной кислоты, в свою очередь гетероферментативные бактерии продуцируют один моль молочной кислоты, один моль диоксида углерода и один моль этанола или уксусной кислоты. Хорошо известно, что в начале процесса брожения преобладают гомоферментативные виды, но затем, когда среда становится более кислой, начинают превалировать гетероферментативные бактерии (Muck, R. E. 2010. *Silage microbiology and its control through additives*. R. Bras.Zootec. Vol. 39. Июль).

Силосные добавки на основе гомоферментативных молочнокислых бактерий улучшают процесс брожения силоса, однако большинство таких заквасочных бактерий незначительно способствуют ингибированию роста дрожжевых и плесневых грибков. При использовании такой силосной добавки аэробная стабильность силоса может быть ниже, чем без какой-либо силосной добавки, и это даже может увеличить риск нагревания силоса.

Некоторые силосные закваски содержат бактерии (например, пропионовокислые бактерии), которые продуцируют пропионовую кислоту. К сожалению, это не повышает аэробную стабильность силоса, поскольку такие микроорганизмы обычно не являются кислотоустойчивыми, а их рост медленный. Однако закваски, которые в дополнение к молочной кислоте продуцируют большое количество уксусной кислоты (*L. buchneri*), действительно подавляют микроорганизмы, вызывающие порчу силоса (дрожжевые грибки, плесневые грибки и т.д.), т.е. они повышают аэробную стабильность силоса и предотвращают порчу силоса при открытии хранилища для силоса или при других видах воздействия воздуха.

Добавление гетероферментативных молочнокислых бактерий в ходе процесса силосования снижает уровень pH и сокращает потери сухого вещества. Кроме того, описано, что некоторые из этих штаммов обладают сильным ингибирующим действием на рост дрожжевых и

плесневых грибков, повышая тем самым аэробную стабильность силоса (Jatkauskas, J., Vrotniakiene, V., Ohlsson, C, Lund, B. 2013. The effect of three silage inoculants on aerobic stability in grass, clover-grass, lucerne and maize silage. Agricultural and Food Science. 22: 137-144).

Однако разные штаммы одного и того же вида не обладают одинаковыми свойствами, поскольку ввиду генетической изменчивости возникают межвидовые различия, т.е. свойства, характерные для штамма.

Задача данного изобретения заключается в обеспечении нового штамма *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 и *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 для повышения качества брожения корма и продления аэробной стабильности и срока хранения силоса.

РАСКРЫТИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение раскрывает изолированные штаммы микроорганизмов *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 и *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651, корм, кормовую добавку и композицию, содержащую один или оба указанных штамма. Корм может быть сброженным кормом, например, силосом. Пищевая добавка представляет собой силосную добавку. Подходящие вспомогательные вещества могут быть включены в состав композиции продукта-добавки в качестве прочих ингредиентов. Указанные микроорганизмы могут использоваться в лиофилизированной форме.

Микроорганизм *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 и *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 обеспечивает аэробную стабильность корма, включая трудноображиваемый корм, например, корм с низким (≤ 20 процентов) содержанием сухого вещества.

Следующей целью изобретения является применение упомянутого микроорганизма для: ускорения брожения корма, увеличения концентрации молочной и уксусной кислот, снижения уровня pH и сокращения потерь питательных веществ в корме и концентрации аммиачного азота и масляной кислоты в корме.

Указанные микроорганизмы (вместе или по отдельности) применяют для сбраживания корма и улучшения брожения, для увеличения концентрации молочной и уксусной кислот в корме, для снижения уровня рН и сокращения тем самым потерь питательных веществ в корме.

Согласно исследованиям антимикробной активности, *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 и *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651, ингибируют рост и активность нежелательных микроорганизмов (патогенных микроорганизмов, дрожжевых и плесневых грибов). Указанными патогенами являются *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophytics*, *Salmonella enterica subsp. Enterica*, серологический вариант *Enteritidis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* и т.д.

Изобретение также относится к способу продления сохранности корма, в котором один или оба микроорганизма *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 и *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 микроорганизм *Lactobacillus brevis* TAK 124-1 NCIMB42149 добавляют в корм во время брожения. В случае, когда используют один из вышеупомянутых штаммов его добавляют в корм со скоростью 1×10^5 – 10×10^6 КОЕ/г сбраживаемого корма.

ОПИСАНИЕ ШТАММОВ

Штаммы микроорганизмов *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 и *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 были изолированы в Эстонии из высококачественного кукурузного силоса (*Zea mays* L.), полученного путем естественного брожения без использования силосных добавок. Для того чтобы определить количественное содержание лактобацилл в образце силоса, из растворов готовили суспензию (с убывающими концентрациями), используя метод десятичного разведения в пептонной воде (Sigma-Aldrich, Франция); затем был сделан посев на Агар MRS (de Man Rogosa Sharpe) (Biolife, Италия), который инкубировали при 37°C в микроаэробной (10 процентов CO₂) среде (термостат „MCO-18AIC UV" Sanyo Electronic Co,

Ltd, Япония) в течение 48 часов. Развившиеся колонии были описаны, определено подсчитанное и общее количество микробов. Для описания морфологии микробов были приготовлены препараты с использованием метода окрашивания по Граму и были выполнены микроскопические исследования. Штаммы *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 и *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 были изолированы на основе колонии и морфологии клеток, характерных для *Lactobacillus* ssp. За этим следовала предварительная и подробная идентификация, описанные ниже.

Морфологические характеристики культур *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 и *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 определяли после роста на агаре MRS и бульоне (Biolife, Италия). *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 представляет собой грамположительную палочкообразную бактерию правильной формы, неподвижную и не образующую спор, встречающуюся отдельно или в коротких цепях. В процессе культивирования в бульоне MRS появляются удлиненные клетки.

Lactobacillus buchneri BioCC 228 DSM 32651 представляет собой грамположительную палочкообразную бактерию правильной формы, неподвижную и не образующую спор, встречающуюся отдельно или в коротких цепях. В процессе культивирования в бульоне MRS появляются длинные и тонкие клетки.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Бульон MRS (в течение 48-72 часов) подходит для культивирования микробного штамма *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 микроаэробно или анаэробно, после чего наблюдается однородный мутящий рост. После 48 часов культивирования при 37°C в микроаэробной (10 процентов CO₂) или анаэробной (CO₂/ N₂/ H₂: 5/90/5 процентов) средах колонии серовато белые, 1,5-2 мм, плоские, блестящие, полупрозрачные с шероховатой поверхностью и закругленными концами.

Микробный штамм *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 обязательно гетероферментативный, каталаза и оксидаза отрицательный, гидролизует аргинин и продуцирует диоксид углерода в процессе брожения глюкозы.

Оптимальная температура роста штамма *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 составляет 37°C, причем штамм также размножается при 15°C. В небольшой степени рост также может наблюдаться при 45°C. Уровень pH, оптимальный для роста штамма, составляет 5,7-6,2.

Бульон MRS (в течение 48-72 часов) подходит для культивирования микробного штамма *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 микроаэробно, после чего наблюдается однородный мутящий рост. После 48 часов культивирования при 37°C в микроаэробной (10 процентов CO₂) или анаэробной (CO₂/ N₂/ H₂: 5/90/5 процентов) средах колонии серовато белые, 1,5-2 мм, плоские, блестящие, полупрозрачные с шероховатой поверхностью и закругленными концами.

Микробный штамм *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 обязательно гетероферментативный, каталаза и оксидаза отрицательный, гидролизует аргинин и продуцирует диоксид углерода в процессе брожения глюкозы.

Оптимальная температура роста штамма *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 составляет 37°C, причем штамм также размножается при 15°C. В небольшой степени рост также может наблюдаться при 45°C. Уровень pH, оптимальный для роста штамма, составляет 5,7-6,2.

Микробный штамм *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 идентифицировали как *Lactobacillus buchneri* с помощью MALDI Biotyper (Bruker Daltonik).

Микробный штамм *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 идентифицировали как *Lactobacillus buchneri* с помощью MALDI Biotyper (Bruker Daltonik).

Штамм *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 был депонирован в соответствии с Будапештским договором о международном признании депонирования микроорганизма для целей патентной процедуры в

немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ) под номером DSM 32650 25 сентября 2017.

Адрес DSMZ: Инхоффенстр. 7В, D-38124 Брауншвейг, Германия.

Штамм *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 был депонирован в соответствии с Будапештским договором о международном признании депонирования микроорганизма для целей патентной процедуры в немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ) под номером DSM 32650 25 сентября 2017.

Адрес DSMZ: Инхоффенстр. 7В, D-38124 Брауншвейг, Германия.

Устойчивость к антибиотикам

Методика: Чувствительность *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 и *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 к антибиотикам испытывали согласно стандарту ISO10932:2010 с помощью пластин VetMIC Lact-1 и VetMIC Lact-2 (Национальный ветеринарный институт SVA, Уппсала, Швеция) в анаэробных (CO₂/ N₂/ H₂: 5/90/5 процентов) условиях при температуре + 37°С в течение 48 часов. Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) сравнивали с пороговыми значениями МИК, опубликованными Европейским агентством по безопасности продуктов питания (EFSA), Таблица 1.

Таблица 1. Значения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) (мг/л) антибиотиков для *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 и *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651

| Антибиотики | <i>Lactobacillus buchneri</i> BioCC 203 DSM 32650 МИК (мг/л) | <i>Lactobacillus buchneri</i> BioCC 228 DSM 32651 МИК (мг/л) | Микробиологические пороговые значения (мг/л) * |
|-------------|---|---|--|
| Ампициллин | 0,5 | 0,03 | 2 |
| Гентамицин | 0,5 | 0,5 | 16 |

| | | | |
|---------------|------|-------|----|
| Стрептомицин | 2 | 0,5 | 64 |
| Эритромицин | 0,06 | 0,016 | 1 |
| Клиндамицин | 0,06 | 0,03 | 1 |
| Тетрациклин | 8 | 2 | 8 |
| Хлорамфеникол | 4 | 0,25 | 4 |
| Канамицин | 2 | 2 | 32 |

* EFSA 2012. Руководство по определению чувствительности бактерий к противомикробным средствам общественного и ветеринарного значения, Журнал EFSA 2012; 10(6):2740

Для оценки бактерий, применяемых в качестве кормовых добавок, штаммы можно подразделить на чувствительные и резистентные к противомикробным средствам:

Чувствительный (S): микробный штамм считается чувствительным, когда он ингибируется при концентрации конкретного антимикробного средства, которая равна или меньше установленного порогового значения ($S \leq x$ мг/л).

Резистентный (R): микробный штамм считается резистентным, когда он не ингибируется при концентрации конкретного антимикробного средства, которая выше установленного порогового значения ($S > x$ мг/л).

Результаты чувствительности штаммов *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 и *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 к антибиотикам представлены в Таблице 1.

Минимальные ингибирующие концентрации для *Lactobacillus buchneri* штаммов BioCC 203 DSM 32650 и *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 не превышали пороговые значения МИК, приведенные для облигатных гетероферментативных *Lactobacillus*, предложенные EFSA.

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ШТАММОВ

Рост в присутствии различных сахаров.

Целью данного эксперимента было исследовать способность штаммов *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 и *Lactobacillus*

buchneri BioCC 228 DSM 32651 к росту в присутствии различных сахаров и подкислению культуральной среды.

Методика: 24-часовые культуры *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 и *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651, культивированные на агаре MRS, суспендировали в пептонной воде в соответствии со стандартом мутности МакФарланда № 5 ($1,5 \times 10^9$ микробов/мл), засеивали при конечной плотности $1,5 \times 10^6$ микробов/мл в модифицированный бульон MRS, содержащий 20 г/л либо глюкозы, фруктозы, трегалозы, ксилозы или мальтозы, либо смесь глюкозы, фруктозы, трегалозы (в соотношении 1:1:1), с конечной концентрацией также 20 г/л. Суспензии инкубировали в термостате микроаэробно (10 процентов CO_2) и анаэробно ($\text{CO}_2/\text{N}_2/\text{H}_2$: 5/90/5 процентов) при 25°C в течение 24, 48 и 72 часов. В анаэробных условиях среду предварительно восстанавливали в течение 24 часов. Фиксировали количество жизнеспособных микроорганизмов обоих штаммов, продуктивность, число генераций (n), и скорость роста (V) рассчитывали следующим образом:

Продуктивность = $\log N_1 - \log N_0$, где N_1 представляет собой концентрацию клеток в любой заданный момент времени, а N_0 представляет собой начальную концентрацию клеток

$n = (\log N_1 - \log N_0) / \log 2$, где N_1 представляет собой концентрацию клеток в любой заданный момент времени, а N_0 представляет собой начальную концентрацию клеток

$V = (\log N_1 - \log N_0) / 0,301 \times t$, где N_1 представляет собой концентрацию клеток в любой заданный момент времени, N_0 представляет собой начальную концентрацию клеток и t это определенный период времени в часах.

Рост штамма *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 был на одно поколение быстрее, чем штамма *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 (Таблица 2) в течение первых 24 часов микроаэробного культивирования в культуральной среде, содержащей глюкозу, фруктозу, ксилозу или смесь глюкозы, фруктозы и трегалозы.

Таблица 2. Влияние различных сахаров на динамику роста *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 и *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 в ходе микроаэробного (10 процентов CO₂) культивирования при 25°С в течение 24, 48 и 72 часов

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

n - число генераций; V - скорость роста; G - бульон MRS с глюкозой; F - бульон MRS с фруктозой; T - бульон MRS с трегалозой; M - бульон MRS со смесью глюкоза-фруктоза-трегалоза; X - бульон MRS с ксилозой; Ma- бульон MRS с мальтозой.

В течение первых 24 часов анаэробного культивирования рост *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 был примерно на два поколения быстрее в среде, содержащей фруктозу или смесь глюкозы, фруктозы и трегалозы; в течение 48 часов на три поколения быстрее в среде, содержащей глюкозу и на 1,5 поколения быстрее в среде, содержащей фруктозу и ксилозу, по сравнению со штаммом *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 (Таблица 3).

Lactobacillus buchneri BioCC 228 DSM 32651 рос медленнее, будучи способным опередить *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 после 48 часов культивирования в среде, содержащей фруктозу, ксилозу и в среде, содержащей смесь глюкозы, фруктозы и трегалозы.

Таблица 3. Влияние различных сахаров на динамику роста *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 и *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 в ходе анаэробного (CO₂/ N₂/ H₂: 5/90/5 процентов) культивирования при 25°С в течение 24, 48 и 72 часов

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

n - число генераций; V - скорость роста; G - бульон MRS с глюкозой; F - бульон MRS с фруктозой; T - бульон MRS с трегалозой; M - бульон MRS со смесью глюкоза-фруктоза-трегалоза; X - бульон MRS с ксилозой; Ma- бульон MRS с мальтозой.

Пример 1. Профиль органических кислот и спиртов.

Целью данного эксперимента было определение профиля органических кислот и спиртов штаммов *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 и *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 в процессе микроаэробного и анаэробного культивирования.

Методика: 24-часовые культуры *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 и *Lactobacillus buchneri* BioCC 228, культивированные на агаре MRS (Biolife, Италия), суспендировали в пептонной воде в соответствии со стандартом мутности МакФарланда № 5 (1,5 x 10⁹ микробов/мл), засеивали при конечной плотности 1,5 x 10⁶ микробов/мл в бульон MRS

(Biolife, Италия), инкубировали в термостате микроаэробно (10 процентов CO₂) и анаэробно (CO₂/ N₂/ H₂: 5/90/5 процентов) при 25°C в течение 24, 48 и 72 часов.

Профиль органических кислот и спиртов был газохроматографическим, определенным на газовом хроматографе Agilent 6890A с капиллярной колонкой CP-Wax 52 CB (30 м x 0,25 мм; 0,25 мкм). Температурная программа колонки: 75°C 1 мин удерживания. 10°C/мин до 115°C 3 мин удерживания. 20°C/мин до 190°C 5 мин удерживания. Детектор (FID) 280°C. Время исследования составляло 26 мин.

В профиле органических кислот и спиртов проявились штамм-специфические характеристики штаммов *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 и *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 (Таблица 4). *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 значительно более сильным продуцентом этанола, уксусной кислоты и молочной кислоты в ходе культивирования как в микроаэробной, так и в анаэробной среде. *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 был способен продуцировать пируват в анаэробной среде (Таблица 4).

В течение первых 24 часов микроаэробного и анаэробного культивирования штамм *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 использовал приблизительно 99,5 процентов и 97,8 процентов соответственно цитрата, изначально присутствовавшего в культуральной среде.

В ходе анаэробного культивирования *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 расходовал 4,8 процента цитрата, изначально присутствовавшего в культуральной среде. В отличие от *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 штамм *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 был способен продуцировать 5,9 процентов цитрата в течение 72 часов микроаэробного культивирования.

Таблица 4. Профиль органических кислот и спиртов (мг/м) в бульоне MRS микроаэробного (10 процентов CO₂) и анаэробного (CO₂/ N₂/ H₂: 5/90/5 процентов) культивирования *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 и *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 в течение 24, 48 и 72 часов при 25°C.

| | <i>Lactobacillus buchneri</i> BioCC 203 DSM 32650 | | | | | | <i>Lactobacillus buchneri</i> BioCC 228 DSM 32651 | | | | | |
|-------------------------|---|------|------|------------------|------|------|---|------|------|------------------|------|------|
| | микроаэробная среда | | | анаэробная среда | | | микроаэробная среда | | | анаэробная среда | | |
| | 24ч | 48ч | 72ч | 24ч | 48ч | 72ч | 24ч | 48ч | 72ч | 24ч | 48ч | 72ч |
| Молочная кислота | 2,69 | 8,22 | 8,07 | 2,85 | 8,21 | 8,19 | 0,00 | 0,00 | 7,79 | 2,76 | 4,96 | 2,76 |
| Уксусная кислота | 0,63 | 1,25 | 1,29 | 0,61 | 1,38 | 1,25 | 0,47 | 0,62 | 0,54 | 0,01 | 0,28 | 0,33 |
| Этанол | 0,59 | 3,91 | 4,02 | 0,58 | 4,69 | 4,36 | 0,03 | 0,03 | 0,09 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Пировиноградная кислота | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,72 | 1,36 | 1,25 |

Пример 2. Профиль органических кислот и спиртов в супернатанте из растений кукурузы.

Целью данного эксперимента было определение профиля органических кислот и спиртов штаммов *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 и *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 в процессе брожения растительного материала.

Методика: 226 г растений кукурузы (*Zea mays* L.) в стадии вегетативного роста (V6-V8) измельчали, гомогенизировали в лабораторном блендере Wagnmixer 400 (interscience, Франция) в воде в течение 6 минут, фильтровали, центрифугировали (5000 оборотов в минуту 10 минут при температуре окружающей среды) и стерилизовали при 121°C в течение 5 минут.

24-часовые культуры *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 и *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651, культивированные на агаре MRS (Biolife, Италия), суспендировали в пептонной воде в

соответствии со стандартом мутности МакФарланда № 5 ($1,5 \times 10^9$ микробов/мл), заседали при конечной плотности $1,5 \times 10^6$ микробов/мл в супернатант из растений кукурузы и инкубировали в термостате микроаэробно (10 процентов CO_2) и анаэробно ($\text{CO}_2/\text{N}_2/\text{H}_2$: 5/90/5 процентов) при 25°C в течение 24, 48 и 72 часов.

Профиль органических кислот и спиртов определялся газохроматографически на газовом хроматографе Agilent 6890A с капиллярной колонкой CP-Wax 52 CB (30 м x 0,25 мм; 0,25 мкм). Температурная программа колонки: 75°C 1 мин удерживания. $10^\circ\text{C}/\text{мин}$ до 115°C 3 мин удерживания. $20^\circ\text{C}/\text{мин}$ до 190°C 5 мин удерживания. Детектор (FID) 280°C .

Органические кислоты определяли жидкостной хроматографией на ВЭЖХ-системе Shimadzu Prominence. Образцы разделяли ионообменной колонке Aminex HPL-87H (300мм x 7,8мм). Колонку термостатировали при температуре 60°C , скорость потока составляла 0,6 мл/мин, а органические кислоты обнаруживали с помощью диодно-матричного детектора (ДМД) при 210 нм. Время исследования составляло 26 мин.

Таблица 5. Профиль органических кислот и спиртов (мг/м) в супернатанте из растений кукурузы микроаэробного (10 процентов CO_2) культивирования *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 и *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 в течение 24, 48 и 72 часов при 25°C .

| | <i>Lactobacillus buchneri</i> BioCC 203 DSM 32650 | | | <i>Lactobacillus buchneri</i> BioCC 228 DSM 32651 | | |
|------------------|--|-------|-------|--|-------|-------|
| | 24ч | 48ч | 72ч | 24ч | 48ч | 72ч |
| Молочная кислота | 0,000 | 0,000 | 0,384 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| Уксусная кислота | 0,060 | 0,129 | 0,181 | 0,062 | 0,102 | 0,191 |
| Этанол | 0,129 | 0,395 | 0,653 | 0,046 | 0,104 | 0,493 |
| 2,3 – бутандиол | 0,015 | 0,007 | 0,004 | 0,007 | 0,011 | 0,005 |

В испытании сбраживания растительного материала *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 оказался более сильным продуцентом

этанола и молочной кислоты по сравнению с *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 (Таблица 5).

Пример 3. Противомикробная активность по отношению к патогенам

Целью данного эксперимента было исследование противомикробной активности *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 и *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 по отношению к энтеропатогенным микробам в процессе микроаэробного и анаэробного культивирования при 25°C.

Для оценки противомикробных свойств *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 и *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 по отношению к патогенам, использовали метод окрашенной струи (Hütt P, Shchepetova J, Loivukene K, Kullisaar T, Mikelsaar M. Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entro- and uropathogens. J Appl Microbiol. 2006; 100(6):1324-32).

Для определения ингибирования роста целевых микробов в миллиметрах измерялась зона, свободная от роста. Среднее арифметическое и стандартное отклонение вычисляли на основании результатов образца (Таблица 6) аналогично тому, как в Hütt et al. (2006) и аналогично оценивали антагонистическую активность (мм).

Таблица 6. Противомикробная активность *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 и *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 против патогенов с использованием метода окрашенной струи на модифицированном агаре MRS в микроаэробной (10 процентов CO₂) и анаэробной (CO₂/N₂/H₂: 5/90/5 процентов) средах (ингибирование роста целевого микроба в мм)

| Патоген | Зона ингибирования роста (мм) | |
|---------|--|--|
| | <i>Lactobacillus buchneri</i> BioCC 203 DSM 32650 | <i>Lactobacillus buchneri</i> BioCC 228 DSM 32651 |

| | Микроаэробная | Анаэробная | Анаэробная | Микроаэробная |
|---|---------------|------------|------------|---------------|
| <i>Staphylococcus saprophyticus</i> WDCM 00159 | 16,5±0,5 | 12,5±0,8 | 14,3±0,8 | 10,0±0,7 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 | 13,8±0,4 | 11,8±0,4 | 14,3±1,3 | 9,8±0,8 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25932 | 18,8±1,5 | 14,8±1,3 | 16,5±0,9 | 12,8±0,4 |
| <i>Escherichia coli</i> DSM 1576 | 14,5±0,9 | 15,5±1,5 | 15,8±0,4 | 12,5±1,1 |
| <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> серологический вариант <i>Enteritidis</i> ATCC 13076 | 14,8±0,4 | 15,3±1,3 | 15,5±0,5 | 13,5±0,8 |

Зона ингибирования в микроаэробной среде (мм-с): слабая <13,80; средняя 13,79–17,11; сильная >17,12. Зона ингибирования в анаэробной среде (мм-с): слабая <10,67; средняя 10,66–14,94; сильная >14,95.

В микроаэробной среде оба штамма проявили одинаково сильную противомикробную активность (Таблица 6). В анаэробной среде *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 оказывает немного более сильное ингибирующее действие на исследованные патогенные микробы.

Пример 4. Противогрибковая активность.

Целью данного эксперимента было определение действия *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 и *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 супернатанта против дрожжевых грибов из кукурузного силоса с использованием метода агаровых диффузионных камер.

Суспензию 48 часовой культуры лактобацилл готовили в пептонной воде в соответствии со стандартом мутности МакФарланда № 5 (1,5 x 10⁹ микробов/мл), заседали в бульон MRS (Biolife, Италия) при конечном объеме в 1,5 x 10⁶ микробов/мл, инкубировали микроаэробно

(10 процентов CO₂) и анаэробно (CO₂/ N₂/ H₂: 5/90/5 процентов) при 25°C в течение 48 и 72 часов. Микробные клетки удаляют путем центрифугирования (4500 оборотов в минуту, 10 мин). Супернатант стерилизовали фильтрацией и концентрировали лиофилизацией. Лиофилизированный супернатант ресуспендировали до 10-кратной концентрации 10мМ уксусной кислоты. Шесть штаммов дикий дрожжей (*Candida* spp) изолированных из кукурузного силоса, высевали в однородный слой на среду PCA (Plate Count Agar, Liofilchem srl. Италия). В агаре асептически нарезали лунки диаметром 6 мм и вносили в лунки 100 мкл образцов супернатанта. После инкубации при 25°C было отмечено следующее противогрибковое действие: нет подавления; + слабое подавление, рост дрожжей нарушен, ++ сильное подавление, рост дрожжей подавлен с заметными чистыми зонами; +++ очень сильное подавление, рост дрожжей подавлен с большими чистыми зонами.

Противомикробные компоненты, продуцируемые *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 ингибируют рост дрожжей растительного более сильно, чем *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650. *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 продуцировал компоненты, ингибирующие рост дрожжей уже в течение 48 часов культивирования, создавая на агаризованной среде вокруг лунки широкую чистую зону ингибирования роста, в то время как супернатант штамма BioCC 203 DSM 32650 только нарушил рост дрожжей.

Пример 5. Динамика роста в процессе брожения растительного материала.

Целью данного эксперимента было определить какое действие оказывает *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 и *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 на динамику роста в процессе брожения растительного материала.

Методика: 226 г растений кукурузы (*Zea mays* L.) в стадии вегетативного роста (V6-V8) измельчали, гомогенизировали с помощью лабораторного блендера Bagmixer 400 (interscience. Франция) в

течение 6 минут, фильтровали, центрифугировали при комнатной температуре при 5000 оборотах в минуту в течение 10 минут и стерилизовали при 121°C в течение 5 минут.

Суспензию 48 часовой культуры лактобацилл готовили в пептонной воде в соответствии со стандартом мутности МакФарланда № 5 ($1,5 \times 10^9$ микробов/мл), заседали в бульон MRS (Biolife, Италия), при конечном объеме $1,5 \times 10^6$ микробов/мл, инкубировали микроаэробно (10 процентов CO₂) и анаэробно (CO₂/ N₂/ H₂: 5/90/5 процентов) при 25°C в течение 24, 48 и 72 часов.

Фиксировали количество жизнеспособных микроорганизмов обоих штаммов, продуктивность, число генераций (n), и скорость роста (V) рассчитывали следующим образом:

Продуктивность = $\log N_1 - \log N_0$, где N₁ представляет собой концентрацию клеток в любой заданный момент времени; N₀ представляет собой начальную концентрацию клеток

$n = \log N_1 - \log N_0 / \log 2$, где N₁ представляет собой концентрацию клеток в любой заданный момент времени; N₀ представляет собой начальную концентрацию клеток

$V = \log N_1 - \log N_0 / 0,301 \times t$, где N₁ представляет собой концентрацию клеток в любой заданный момент времени; N₀ представляет собой начальную концентрацию клеток и t это определенный период времени в часах.

Таблица 7. Динамика роста *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 и *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 в ходе микроаэробного (10 процентов CO₂) культивирования при 25°C в течение 24, 48 и 72 часов

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

n – число генераций; V – скорость роста

В течение первых 24 часов микроаэробного культивирования штамм *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650 был на четыре поколения быстрее и в 2,4-раза быстрее в течение 48 часов, чем штамм *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651 (Таблица 7).

Пример 6. Исследование действия силосных добавок *L. buchneri* BioCC 203 DSM 32650 и *L. buchneri* BioCC 228 DSM 32651 на среду свежего легкообрабатываемого материала.

Целью данного эксперимента было определить какое действие оказывает силосная добавка *L. buchneri* BioCC 203 DSM 32650 и *L. buchneri* BioCC 228 DSM 32651 на аэробную стабильность и качество брожения кукурузного (*Zea mays*, кукуруза сорта «Cathy») силоса (содержание сухого вещества ≥ 30 процентов).

Испытание силоса проводили в лабораторном 1,5 литровом силосе со свежесрезанной кукурузой в фазе восковой спелости.

Проводили следующие исследования: определение значений pH и качества брожения на 90 день.

Были проведены два теста на аэробную стабильность. Первый тест был проведен после периода хранения в течение 49 дней с двойным воздействием воздуха (24 часа; на 28 день и 42 день).

Тест на аэробную стабильность проводили в помещении с контролируемой температурой приблизительно при 20°C. Температуру фиксировали каждые пять часов с помощью системы регистрации данных PS-ES.

Химический состав свежего материала представлен в таблице 8.

Таблица 8. Химический состав свежего материала

| | |
|------------|--------------------------------------|
| Показатель | Кукуруза сорта «Cathy» 09.10.2017 |
|------------|--------------------------------------|

| | |
|---|-----|
| Сухое вещество (СВ) г/кг | 339 |
| Сырая зола, г/кг СВ | 30 |
| Сырой протеин, г/кг СВ | 71 |
| Сырой жир, г/кг СВ | 25 |
| Сырая клетчатка, г/кг СВ | 181 |
| Сырой крахмал, г/кг СВ | 328 |
| Водорастворимые углеводы (ВРУ) , г/кг СВ | 87 |
| Нитраты, г/кг СВ | 587 |
| Буферная емкость (БЕ), г молочной кислоты/кг СВ | 23 |
| Коэффициент брожения* | 64 |

* СВ в процентах + (8х(ВРУ/БЕ))

Применение *L. buchneri* BioCC 203 DSM 32650 и *L. buchneri* BioCC 228 DSM 32651 ведет к существенному увеличению уксусной кислоты и 1,2-пропандиола по сравнению с необработанным (Таблица 9).

Таблица 9. Химический состав, показатели пищевой ценности и показатели качества брожения кукурузного силоса из кукурузы сорта «Cathy» с применением микроорганизмов *L. buchneri* BioCC 203 DSM 32650 и *L. buchneri* BioCC 228 DSM 32651 после 90 дней хранения.

| Показатель | Необработанный контроль | <i>L. buchneri</i> BioCC 203 DSM 32650 | <i>L. buchneri</i> BioCC 228 DSM 32651 |
|----------------------------|-------------------------|--|--|
| Сухое вещество, % | 34,6 | 34,5 | 35,5 |
| Сырой протеин, % | 6,9 | 7,0 | 7,1 |
| Сырая зола, % | 3,2 | 3,3 | 3,4 |
| Сырая клетчатка, % | 20,1 | 20,9 | 20,7 |
| Сырой крахмал, % | 31,5 | 29,8 | 30,4 |
| Этанол, г/кг | 10 | 10 | 10 |
| Уксусная кислота, г/кг | 12 | 19 | 19 |
| Пропионовая кислота, г/кг | н.о. | н.о. | н.о. |
| Валерьяновая кислота, г/кг | | | |
| Масляная кислота, г/кг | н.о. | н.о. | н.о. |

| | | | |
|-------------------------------|-----|-----|-----|
| Молочная кислота, г/кг | 79 | 67 | 65 |
| 1,2-пропандиол, г/кг | 1 | 7 | 7 |
| pH | 3,7 | 3,8 | 3,8 |
| NH ₃ -N/общий N, % | 7,7 | 7,7 | 8,1 |

н.о. – не обнаружено

Тест на аэробную стабильность выполненный по истечению периода хранения в 49 дней показал существенное увеличение аэробной стабильности для силосов, обработанных *L. buchneri* BioCC 203 DSM 32650 и *L. buchneri* BioCC 228 DSM 32651 почти от 2 до 2,5 дней по сравнению с необработанным контрольным образцом (контроль: 3,9 дня против *L. buchneri* BioCC 203 DSM 32650: 6,3 дней и *L. buchneri* BioCC 228 DSM 32651: 5,8 дней).

Увеличение времени хранения до 90 дней привело к увеличению аэробной стабильности как для необработанного контрольного образца с 7,9 днями, так и для силоса, обработанного *L. buchneri* BioCC 203 DSM 32650 10,6 днями и силоса, обработанного *L. buchneri* BioCC 228 DSM 32651 с 11,4 днями. Было обнаружено, что такая разница в менее чем три дня для *L. buchneri* BioCC 203 DSM 32650 и в более чем три дня для *L. buchneri* BioCC 228 DSM 32651 является статистически значимой.

Пример 7. Исследование действия силосных добавок *L. buchneri* BioCC 203 DSM 32650 и *L. buchneri* BioCC 228 DSM 32651 на свежий трудноображиваемый материал.

Целью данного эксперимента было определить качество брожения и аэробную стабильность силоса, приготовленного из свежесрезанных растений кукурузы (*Zea mays*, кукуруза сорта «Dorka») с низким содержанием сухого вещества (≤ 20 процентов) с применением штаммов микроорганизмов *L. buchneri* BioCC 203 DSM 32650 и *L. buchneri* BioCC 228 DSM 32651.

Штаммы *L. buchneri* BioCC 203 DSM 32650 и *L. buchneri* BioCC 228 DSM 32651 добавляли в силосуемый материал в виде жидкого раствора с

концентрацией 1×10^5 КОЕ на 1 г растительного материала (корма), подлежащего силосованию. Все исследуемые варианты (контрольные силосы, силосы, приготовленные с штаммами *L. buchneri* BioCC 203 DSM 32650 и *L. buchneri* BioCC 228 DSM 32651 молочнокислых бактерий и контрольные силосы, приготовленные без силосных добавок) в пяти параллельных опытах. Исследуемые силосы открывали после 90 дней силосования.

Химический состав свежего материала представлен в Таблице 10.

Аэробную стабильность силосов определяли по истечению срока хранения в 90 дней в соответствии с методом, описанным Хонигом (Honig, H., 1990: Evaluation of the aerobic stability. In: Proceedings of the Eurobac Conference, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala/Sweden, Special Issue). Силос считался аэробно нестабильным, если температура, измеренная у его геометрической середины, превышала температуру окружающей среды на 3°C . Изменения температуры во времени измеряли в течение 9 дней (217 часов). Температуру окружающей среды и температуры исследуемых силосов записывали раз в час, используя устройства Comet Temperature Data Logger S0141.

Для анализа образцов силоса использовали общепринятые методы (AOAC. 2005. Official methods of analysis of AOAC International, 18th ed. Association of Official Analytical Chemists International, Gaithersburg, MD, USA).

Для определения содержания сухого вещества образцы силоса высушивали в термостате при 130°C до постоянной массы. Для установления содержания сырой золы образец силоса сжигали в муфельной печи при 550°C в течение шести часов. Содержание протеина определяли, используя анализатор Kjeltac™ 2300 в соответствии со способом Кьельдаля (Nx6,25). Сырую клетчатку определяли согласно способу В. Хеннеберга и Ф. Стохманна. Для определения содержания кислот, этанола и 2,3-бутандиола в силосе использовали газовый хроматограф Agilent 7890A. Соотношение аммиачного азота к общему

азоту определяли анализатором Kjeltec™ 2300. Для определения кислотности силоса использовали рН-метр Hanna Instruments HI 2210.

Таблица 10. Химический состав свежего материала

| Показатель | Кукуруза сорта «Dorka» 20.10.2017 |
|---------------------------------------|--------------------------------------|
| Сухое вещество, % | 19,5 |
| В сухом веществе: | |
| Сырого протеина, % | 9,0 |
| Сырой золы, % | 4,9 |
| Сырой клетчатки, % | 22,3 |
| Сырого жира, % | 2,1 |
| Безазотистых экстрактивных веществ, % | 61,7 |
| Кальция г/кг | 3,3 |
| Фосфора, г/кг | 3,4 |

Содержание сухого вещества во всех силосах находилось в пределах ≤ 18 процентов. Однако силосы из кукурузы сорта «Dorka» и обработанные штаммом *L. buchneri* BioCC 203 DSM 32650 и штаммом *L. buchneri* BioCC 228 DSM 32651 имели хорошие характеристики брожения (Таблица 11). Молочная кислота была преобладающей кислотой во всех силосах. Силос, обработанный штаммом *L. buchneri* BioCC 203 DSM 32650 имел более высокую концентрацию уксусной кислоты и 1,2-пропандиола по сравнению с силосом, приготовленным со штаммом *L. buchneri* BioCC 228 DSM 32651 и контрольным силосом.

Содержание этанола было низким во всех силосах (диапазон от 4,1 до 8,6 г/кг).

Таблица 11. Химический состав, показатели пищевой ценности и показатели качества брожения кукурузного силоса из кукурузы сорта «Dorka» с применением микроорганизмов *L. buchneri* BioCC 203 DSM 32650 и *L. buchneri* BioCC 228 DSM 32651 после 90 дней хранения.

| Показатель | Необработанный контрольный | <i>L. buchneri</i> BioCC 203 DSM 32650 | <i>L. buchneri</i> BioCC 228 DSM 32651 |
|--|-------------------------------|--|--|
| Сухое вещество, % | 18,0 | 17,8 | 17,8 |
| В сухом веществе: | | | |
| Сырого протеина, % | 9,6 | 9,7 | 9,5 |
| Сырой золы, % | 5,3 | 5,5 | 5,6 |
| Сырой клетчатки, % | 23,9 | 24,3 | 24,4 |
| Сырого жира, % | 2,7 | 2,7 | 2,7 |
| Безазотистых экстрактивных веществ, % | 58,5 | 57,9 | 57,8 |
| Кальция, г/кг | 4,1 | 4,1 | 4,3 |
| Фосфора, г/кг | 3,6 | 3,7 | 3,7 |
| Метаболическая энергия, МДж/кг | 10,3 | 10,3 | 10,3 |
| Метаболический протеин, г/кг | 76 | 76 | 76 |
| Баланс протеина в рубце, г/кг | -33 | -32 | -34 |
| Перевариваемость органического вещества, % | 68 | 68 | 68 |
| Этанол, г/кг | 5,7 | 4,1 | 4,6 |
| Уксусная кислота, г/кг | 33,3 | 44,3 | 41,2 |
| Пропионовая кислота, г/кг | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Валерьяновая кислота, г/кг | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| Масляная кислота, г/кг | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| Молочная кислота, г/кг | 85,5 | 83,0 | 84,8 |
| Всех кислот | 118,8 | 127,3 | 126,1 |
| 1,2-пропандиол, г/кг | 5,4 | 20,5 | 16,7 |
| 2,3-бутандиол, г/кг | 1,5 | 1,4 | 1,5 |
| pH | 3,6 | 3,6 | 3,6 |

| | | | |
|-------------------------------|-----|-----|-----|
| NH ₃ -N/общий N, % | 4,7 | 4,7 | 4,7 |
| Аэробная стабильность, ч | 149 | 217 | 217 |

Микробиологические показатели качества брожения засилосованного материала и кукурузного силоса представлены в Таблице 12. В засилосованном материале количество плесневых грибов было относительно большим, клостридий и дрожжевых грибов - ниже предела обнаружения. Образцы силоса, обработанного штаммами *L. buchneri* BioCC 203 DSM 32650 и *L. buchneri* BioCC 228 DSM 32651 имели очень большое количество молочнокислых бактерий (> 8,0 log₁₀ КОЕ/г силоса) и добавленные штаммы преобладали над эндогенной лактобиотой. Количество молочнокислых бактерий в необработанном контрольном силосе составляло 4,56 log₁₀ КОЕ/г силоса.

Таблица 12. Микробиологические показатели качества брожения свежего материала и силоса из кукурузы сорта «Dorka», обработанного микроорганизмами *L. buchneri* BioCC 203 DSM 32650 и *L. buchneri* BioCC 228 DSM 32651

| Показатель | Свежий материал | | Необработанный контрольный | | <i>L. buchneri</i> BioCC 203 DSM 32650 | | <i>L. buchneri</i> BioCC 228 DSM 32651 | |
|-------------------------|---------------------------|----------------------------------|----------------------------|----------------------------------|--|----------------------------------|--|----------------------------------|
| | Среднее log ₁₀ | Стандартная ошибка среднего (SD) | Среднее log ₁₀ | Стандартная ошибка среднего (SD) | Среднее log ₁₀ | Стандартная ошибка среднего (SD) | Среднее log ₁₀ | Стандартная ошибка среднего (SD) |
| Молочнокислые бактерии | 3,80 | 0,32 | 4,56 | 0,62 | 8,3 | 0,03 | 8,25 | 0,55 |
| Дрожжевые грибки | <2* | ** | <2* | ** | <2* | ** | <2* | ** |
| Плесневые грибки | 5,78 | 0,7 | <2* | ** | <2* | ** | <2* | ** |
| <i>Clostridium</i> spp. | <4 | ** | <2* | ** | <2* | ** | <2* | ** |

* - ниже предела обнаружения

** - не может быть рассчитано

При испытании аэробной стабильности в четырех из пяти параллельных опытов необработанный силос нагревался. Средняя аэробная стабильность контрольного силоса оказалась 149 часов (т.е. 6,2 дней). Силосы, обработанные штаммами *L. buchneri* BioCC 203 DSM 32650 и *L. buchneri* BioCC 228 DSM 32651 были аэробно стабильными до окончания исследования, т.е. до 217 часов (т.е. 9,04 дней). Таким образом, обработка свежего материала штаммами *L. buchneri* BioCC 203 DSM 32650 и *L. buchneri* BioCC 228 DSM 32651 повышала аэробную стабильность силосов на 2,84 дня.

В заключение: штаммы *L. buchneri* BioCC 203 DSM 32650 и *L. buchneri* BioCC 228 DSM 32651 неожиданно продемонстрировали очень бурный рост в силосах, приготовленных из свежего трудноображиваемого материала. Применение *L. buchneri* BioCC 203 DSM 32650 и *L. buchneri* BioCC 228 DSM 32651 увеличивает содержание молочной кислоты и уксусной кислоты в силосе, приготовленном из силосуемого материала с низким содержанием сухого вещества (≤ 20 процентов), ингибирует активность микроорганизмов и дрожжей, предотвращая таким образом нагревание силоса, что гарантирует аэробную стабильность силоса при открывании хранилища для силоса и продляет таким образом срок хранения силоса.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Изолированный штамм микроорганизма *Lactobacillus buchneri* BioCC 203 DSM 32650.
2. Изолированный штамм микроорганизма *Lactobacillus buchneri* BioCC 228 DSM 32651.
3. Штамм микроорганизма по п.1 или п.2 в лиофилизированной форме.
4. Композиция, содержащая один или более микроорганизм по любому из пп. 1-3.
5. Корм, содержащий штамм микроорганизма по любому из пп. 1-3.
6. Корм по п.5, который представляет собой сброженный корм, например, силос.
7. Применение штамма микроорганизма по любому из пп. 1-3 в качестве кормовой добавки.
8. Применение штамма микроорганизма по любому из пп. 1-3 для поддержания аэробной стабильности силоса.
9. Применение по п.8, в котором силос приготовлен из корма с низким содержанием сухого вещества (≤ 20 процентов).
10. Применение штамма микроорганизма по любому из пп.1-3 для сбраживания корма.
11. Композиция, содержащая один или более микроорганизм по любому из пп. 1-3 для ускорения брожения корма, увеличения концентрации молочной и уксусной кислот в корме, снижения уровня pH и, следовательно, сокращения потерь питательных веществ в корме.
12. Применение микроорганизма по любому из пп.1-3 для подавления действия патогенных микробов и ингибирования роста дрожжевых грибков за счет добавления штамма микроорганизма по любому из пп.1-3 в корм, подвергаемый сбраживанию.
13. Применение по п.12, в котором патогенные микробы являются энтеропатогенными.
14. Способ продления сохранности корма, в котором микроорганизм по любому из пп.1-3 добавляют в корм до брожения.