

Закваски: сухие или живые?

Г.Ю.Лаптев
Н.И.Новикова
Е.А.Йылдырым
Л.А.Ильина
В.А.Филиппова
С.Н.Биконя
ООО "БИОТРОФ"

Можете ли вы представить себе человека, отдавшего предпочтение кружке восстановленного сухого молока вместо стакана свежего натурального? Ответ на этот вопрос очевиден.

Если перенести эту аналогию на область распространения продукции для кормопроизводства, то возникает некоторое недоумение по поводу обилия на отечественном рынке заквасок на основе высушенных штаммов лактобактерий.

Конечно, логика производителей сухих заквасок вполне понятна: удобство расфасовки, простота транспортировки при территориальной удаленности производственных предприятий от потребителя, увеличение срока годности препаратов, отсутствие зависимости от температурных условий при хранении.

Однако, как показывает опыт прошлых лет, перед специалистами и руководителями многих хозяйств, применяющими сухие закваски на основе лактобактерий, в сезон вскрытия траншей возникает ряд проблем: испорченный силос с низкими биохимическими показателями качества, а также падение удоев и ухудшение состояния здоровья животных при его скармливании.

Располагая более чем 30-летним опытом в области производства заквасок и высокооснащенной современной научной базой, мы задались целью разобраться в сложившейся ситуации.

Высушенные лактобактерии в силосе неконкурентно-способны

В лаборатории ООО «БИОТРОФ» специалистами по молекулярно-генетическим исследованиям был проведен анализ микрофлоры двух силосов полуторамесячного срока хранения. Для силосования использовали различные закваски: **сухую** — на основе высушенных штаммов *Lactobacillus plantarum* и комплекса ферментов (образец закваски № 1), а также **жидкую** — на основе *L. plantarum* (Биотроф).

Исследование силосов проводили с использованием метода **NGS-секвенирования** (Next-Generation Sequencing). NGS-секвенирование — это один из наиболее современных молекулярно-генетических методов для исследования видового состава микробных сообществ, основанный на изучении особенностей структуры ДНК, без высева на питательные среды. Молекулярно-генетические исследования кормов произвели революцию в области микробиологии силосования. Благодаря их использованию признано существование гораздо большего числа микроорганизмов, чем предполагалось ранее: число ранее известных бактерий составляет не более 50%.

Рисунок 1 наглядно иллюстрирует то, что в силосе, заложеном с сухой закваской, получили возможность бурно развиваться представители нежелательной микрофлоры: бактериоиды (78%), снижающие питательность силоса и препятствующие подкислению кислот-утилизирующие бактерии (14%). Как следствие, был получен силос низкого качества. В силосе, заготовленном с жидкой закваской Биотроф, происходил правильный процесс брожения: преобладали лактобактерии (87,7%), которые обеспечивают быстрое подкисление консервируемой массы за счет накопления молочной кислоты и подавления нежелательных

микроорганизмов. Положительно сказалась жидкая закваска и на показателях питательности силоса: сохранности сырого протеина и содержания ОЭ.

Микотоксины в силосе с сухими заквасками

Стоит отметить, что результаты мониторинга содержания микотоксинов в силосах из животноводческих хозяйств, проведенного в различных странах, показали, что высокая частота совместной встречаемости микотоксинов наблюдается повсеместно. Так, исследования, проведенные в Германии в 1998 году, показали, что высокие концентрации ДОН и зеараленона были обнаружены в 79% и 96% исследованных кукурузных силосов из животноводческих хозяйств соответственно.

В России проводится контроль качества микотоксинов в зерне и комбикормах, однако в связи с высокой стоимостью анализов отсутствует мониторинг распространения микотоксинов в объемистых кормах собственной заготовки. Лишь в единичных животноводческих хозяйствах проводится анализ скармливаемого силоса на содержание в нем микотоксинов. Именно поэтому у специалистов и руководителей хозяйств создается видимость отсутствия данной проблемы.

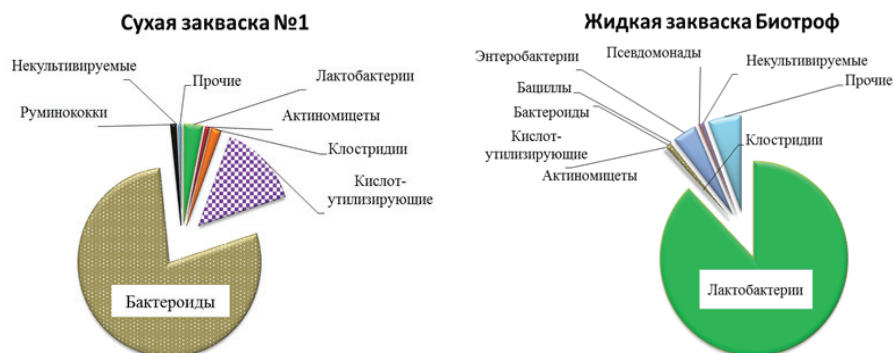


Рис. 1. Микробиологический состав силосов

В связи с этим, научным коллективом компании «БИОТРОФ» было проведено исследование содержания микотоксинов в силосе 7-месячного срока хранения, заложенном с использованием **закваски иностранного производства на основе высушенных штаммов лактобактерий** *Pedococcus acidilactici*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis* (образец закваски №2). Данные приведены в таблице 1, где для сравнения указаны средние результаты мониторинга микотоксинов в силосе, заложенном в животноводческих хозяйствах различных регионов Российской Федерации с жидкими заквасками Биотроф и Биотроф-111 (ООО «БИОТРОФ», Санкт-Петербург) (40 проб) и без применения биологических заквасок (142 образца).

В связи с тем, что сложные комбинации токсических грибковых метаболитов формируются уже в поле на вегетирующих растениях, присутствие микотоксинов было обнаружено во всех пробах. При этом использование жидких заквасок производства ООО «БИОТРОФ» позволило значительно снизить содержание афлатоксинов, охратоксина А, Т-2 токсина, зеараленона и фумонизина по сравнению с контрольным вариантом. Это связано с антифунгальной активностью штаммов, входящих в состав данных препаратов, а также с присущими им свойствами биодеструкции. Количество практически всех микотоксинов (кроме ДОН и зеараленона) в вариантах с применением сухой закваски №2 было даже выше, чем в вариантах без добавок.

Высушить без потери активности можно только спорообразующие!

Возникает вопрос: в чем же причина бурного развития нежелательных бактерий и накопле-

ния микотоксинов в силосе, заложенном с сухими заквасками?

Обращаясь к данным научной литературы, стоит отметить, что все бактерии по своим физиологическим характеристикам можно разделить на две обширные группы: спорообразующие и неспорообразующие.

Спорообразующие бактерии имеют в своем цикле развития покоящиеся структуры (эндоспоры) для длительного выживания в неблагоприятных условиях, что позволяет им с успехом **переносить высушивание**.

Лактобактерии же не обладают способностью к образованию спор. Поэтому лиофильная **сушка — это стрессовый фактор** для данных микроорганизмов, активность их при попадании в силосную массу после «летаргического сна» восстанавливается не сразу, а через длительное время. При этом первые сутки силосования являются наиболее важной и уязвимой фазой, определяющей ход дальнейшего процесса брожения. Аэробные условия в этот период приводят к бурному развитию спонтанных эпифитных нежелательных микроорганизмов, в том числе плесеней — продуцентов микотоксинов. Жидкая закваска, содержащая штаммы в физиологически активном состоянии, не имеет отсроченного действия, подавляя нежелательную микрофлору уже в первые часы после закладки силоса.

А всегда ли соответствует заявленный титр реальности?

Специалистами-микробиологами был проведен анализ соответствия реального бактериального титра микроорганизмов, входящих в состав жидкой закваски Биотроф, и потерпевшей неудачу в эксперименте по силосованию высушенной закваски №1, с титрами, которые заявляют производители.

Для этого использовали классические высевы на питательные среды.

Из таблицы 2 следует, что сухая закваска содержала меньше полезных бактерий, чем заявлено производителем. Таким образом, при лиофильной сушке часть молочнокислых бактерий гибнет. А вот реальный титр бактерий жидкой закваски Биотроф был выше заявленного в 9,2 раза.

Сухие спят, а жидкие работают

В следующем эксперименте в модельных условиях было проведено сравнение скорости размножения микроорганизмов *L. plantarum*, входящих в состав жидкой закваски Биотроф, и сухой закваски с использованием современного молекулярно-генетического метода ПЦР в реальном времени.

Рабочий раствор бактерий, входящих в состав заквасок, вносили в равной концентрации в жидкую универсальную питательную среду для культивирования лактобактерий. Результирующая концентрация бактерий обеих заквасок в среде составляла $4,5 \times 10^5$ КОЕ/мл (по результатам ПЦР в реальном времени).

Результаты исследования динамики скорости размножения бактерий *L. plantarum* методом ПЦР в реальном времени представлены на рисунке 2.

Уже через сутки культивирования концентрация *L. plantarum* в варианте с использованием **Биотрофа** на 3 порядка превосходила исходную концентрацию бактерий в рабочем растворе закваски **Биотроф**.

Через 24 часа культивирования количество клеток бактерий, входящих в состав препарата **Биотроф**, составляло $1,2 \times 10^9$ клеток/мл, т.е. в 7,7 раз больше, чем через 24 часа культивирования микроорганизмов, входящих в состав **сухой закваски №1**.

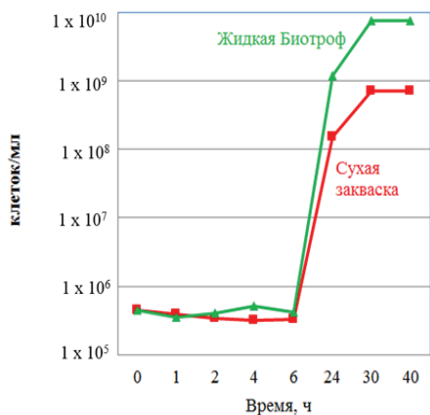


Рис. 2. Скорость размножения *L. plantarum* методом ПЦР в реальном времени

Вариант	Афлатоксины	Охратоксин А	ДОН	Т-2 токсин	Зеараленон	Фумонизин
Без добавок	11,6	50,4	1294,3	149,9	174,7	198,7
Сухая закваска №2	21,1	98,6	850,0	327,4	169,6	380,0
Жидкие закваски Биотроф	10,0	21,9	1223,1	84,9	106,2	137,5

Закваски на основе <i>L. plantarum</i>	Титр бактерий согласно паспорту качества, КОЕ/г(мл)	Реальный титр, КОЕ/г(мл)	Соответствие паспорту качества
Сухая закваска №1	1×10^{10}	$9,0 \times 10^9$	90% бактерий от заявленного количества жизнеспособны
Жидкая закваска Биотроф	$1,0 \times 10^9$	$9,2 \times 10^8$	Реальный титр выше заявленного в 9,2 раза

Таблица 3. Значения параметров, характеризующих активность лактобактерий

Вариант	Вероятность образования колоний (λ), ч ⁻¹	Время задержки размножения (tr), ч
Биотроф	0,086	15,2
Сухая закваска №1	0,073	28,6

Таблица 4. Результаты анализа эффективности консервантов при силосовании многолетних трав в Ленинградской области

Закваска	Микроорганизмы в составе закваски	Доля партий силоса от общего количества, %			Кол-во изученных партий силоса
		Доля молочной к-ты > 70%	Неблагоприятный уровень рН	Содержание масляной к-ты > 0,5%	
Жидкая Биотроф	Лактобактерии	53,3	12,7	6,7	30-47
Жидкая Биотроф-111	Бациллы	46,6	22,2	13,7	18-30
Сухая закваска, образец №3	Лактобактерии	34,8	31,9	37,8	37-47
Сухая закваска, образец №4	Лактобактерии	54,5	22,2	9,1	9-11
Поваренная соль		14,3	33,3	57,1	14-22

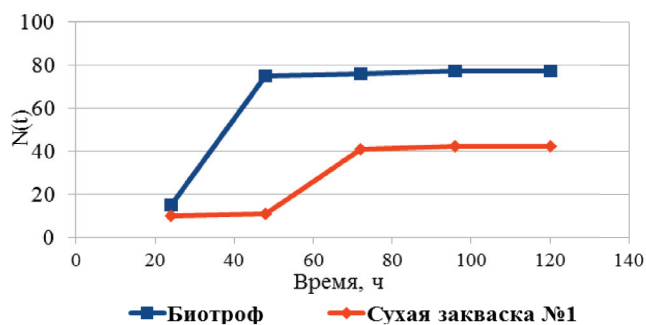


Рис. 3. Расписание появления колоний лактобактерий, входящих в состав заквасок

Через 30 часов культивирования содержание бактерий, входящих в состав препарата **Биотроф**, достигло $7,6 \times 10^9$ клеток/мл, т.е. в 10,8 раз больше, чем в варианте с **сухой закваской №1**.

Для более глубокого понимания разницы процессов динамики увеличения содержания бактерий, входящих в состав жидких и сухих препаратов, был выбран **метод Хаттори**. Это метод определения физиологического состояния различных микроорганизмов, который позволяет дать количественную оценку различиям в активности бактериальных популяций.

В результате наблюдения за процессом культивирования микроорганизмов на твердых питательных средах Хаттори установил, что колонии бактерий при прочих равных условиях (состав питательной среды, температура и т. д.) имеют различную динамику увеличения численности до уровня визуального обнаружения. Эта динамика описывается следующим уравнением:

$$N(t) = N_{\infty} (1 - e^{-\lambda(t-tr)}), \quad (t > tr)$$

где $N(t)$ – количество колоний бактерий в момент времени t ;
 N_{∞} – финальное число колоний;

λ – вероятность образования колоний отдельной бактериальной клеткой в единицу времени;
 tr – время задержки размножения (т.е. время до образования видимой невооруженным глазом колоний).

Таким образом, показатели N_{∞} , λ и tr характеризуют физиологическое состояние бактериальных популяций. На рис. 3 представлено расписание появления колоний молочнокислых бактерий, входящих в состав двух заквасок, на универсальной питательной среде. Для сравнения использовали жидкую закваску Биотроф и высушенную закваску №1.

Далее с помощью метода наименьших квадратов были рассчитаны параметры λ и tr (табл. 3). Из полученных данных видно, что время задержки размножения бактерий (tr) у сухой бактериальной закваски №1 составляет более суток. При этом время задержки размножения бактерий у жидкой закваски Биотроф практически в 2 раза меньше и составляет лишь 15,2 ч.

Насколько эффективны жидкие и сухие закваски в производственных условиях?

Полученные данные о более выраженной степени активности жидких заквасок (Биотроф и Биотроф-111) по сравнению с высушенными подтвердили результаты многолетнего мониторинга биохимических показателей качества силоса, заложенного в траншеях различных животноводческих хозяйств Ленинградской области. Для сравнения в опыт были включены варианты с использованием в качестве консерванта поваренной соли. Риск возникновения нежелательных брожений оценивался по процентному количеству партий корма, оказавшихся в «зоне риска»: количество молочной кислоты ниже 70% в сумме кислот, неблагоприятный уровень рН, содержание масляной кислоты больше 0,5% в сухом веществе (табл. 4).

Судя по биохимическим показателям качества, наилучшим консервирующим эффектом обладали закваски на основе живых бактерий производства ООО «БИОТРОФ» по сравнению с более дорогостоящими высушенными консервантами зарубежного производства. Применение поваренной соли в качестве консерванта оказалось неэффективным.

Таким образом, в отличие от «спящих» бактерий, входящих в состав высушенных заквасок, «высокоактивные» бактерии жидкой закваски Биотроф начинают «работать» значительно быстрее, увеличивая свою численность намного эффективней. Именно поэтому использование жидкой закваски приводит к быстрому подкислению силоса и подавлению нежелательных микроорганизмов, в том числе патогенов и грибов-продуцентов микотоксинов, уже в первые сутки силосования. В процессе хранения корма штаммы-биодеструкторы, входящие в состав жидкой закваски Биотроф, осуществляют трансформацию микотоксинов до нетоксичных соединений. Это позволяет получить безопасный силос с высокими показателями питательности.



ООО «БИОТРОФ»

Санкт-Петербург, г. Пушкин,
 ул. Малиновская, д. 8, лит. А, пом. 7-Н
 +7 (812) 322-85-50, 322-65-17, 452-42-20
 biotrof@biotrof.ru
<http://biotrof.ru>