



Г. Ю.Лаптев  
Е.А.Йылдырым  
И.Л.Маркман  
Л.А.Ильина  
Д.Г.Тюрина  
Н.И.Новикова  
В.А.Филиппова  
А.В.Дубровин  
Е.С.Пономарева  
К.А.Калиткина  
ООО «Биотроф»

## Сухая закваска: без потери активности

Скоро начнется важнейший для производителей молока период - сезон заготовки кормов. Агропроизводителям важно обеспечить высокое качество и безопасность силоса и сенажа, что будет являться гарантией роста продуктивности.

Давно известно, что силосование кормов — это процесс микробиологической ферментации, на исход которого можно существенно повлиять, внося закваски на основе культур микроорганизмов. Однако, стоит помнить, что «заселить» растительную массу бактериями — очень трудная задача. Ведь этот процесс не подчиняется принципам «Что внес — тем и заселил» и «Много внес — значит, заселил».

Основное препятствие в том, что силос — это агрессивная для чужеродных искусственно внесенных штаммов среда. Во-первых, в силосе в результате подвяливания растительной массы создается высокое осмотическое давление. С другой стороны, происходит активный процесс размножения разнообразной, а главное, приспособленной и высококонкурентной местной микрофлоры

поверхности растений (эпифитной).

Поэтому эффективное использование бактерий в качестве силосных заквасок напрямую зависит от их активности и свойств, прежде всего, от конкурентоспособности: толерантности (устойчивости) к осмотическому давлению, способности к высокой скорости синтеза органических кислот и других антимикробных компонентов. Большинство штаммов из присутствующих на рынке заквасок не способны выжить в такой среде. Разберемся, почему.

### Много не значит эффективно

Очевидно, что живые бактерии — это скоропортящийся продукт. Этот факт привел к необходимости зарубежных производителей заквасок на основе лактобактерий, территориально удаленных от потребителя, пользоваться

методами лиофильного высушивания бактерий.

Однако производители умалчивают, что лиофильное высушивание — это технологически сложный процесс, который включает 3 агрессивных по отношению к бактериям, не образующим спор, этапа:

- 1) замораживание клеток;
- 2) первичную сушку, в течение которой замороженная вода удаляется при субнулевых температурах;
- 3) вторичную сушку, при которой из сухого препарата при положительных температурах удаляется незамороженная вода.

На каждом этапе происходят серьезные повреждения клеточной стенки и клеточных компонентов, особенно цитоплазматической мембраны, белков, ДНК, происходит окисление липидов. Поскольку проницаемость клетки связана с клеточ-



Рис. 1. Гены адаптации к стрессам у *B. subtilis* 111

ной мембраной, ее «травмирование» при лиофильной сушке приводит к «просачиванию», а, значит, повышенной чувствительности к соли в среде. А ведь в результате подвяливания растительной массы в силосе создается высокое осмотическое давление. Поэтому эффективное использование бактерий в качестве силосных заквасок напрямую зависит от толерантности к нему. Следовательно, выжить в силосе высушенные лактобактерии с поврежденными мембранами уже не смогут, он окажется слишком агрессивной для них средой.

С другой стороны, генетический аппарат прокариот, к которым относятся бактерии, в отличие от более высокоорганизованных эукариот, не защищен ядерной оболочкой. Поэтому лиофильное высушивание приводит к повреждению их ДНК, а значит, «ломаются» гены, которые контролируют работу ферментов. Именно поэтому при высушивании происходит значительное снижение синтеза и активности ферментов, а, значит, и способности к производству молочной кислоты и других важных веществ, жизненно необходимых при ферментации кормов. Исследования показывают, что у бактерий, подвергшихся лиофилизации, снижена и антагонистическая активность.

Такие бактерии не могут конкурировать с местной микрофлорой, поэтому большая их часть при внесении в силос гибнет. Эти препятствия перед созданием качественных препаратов вынуждают производителей повышать количество таких «полу-

мертвых» лактобактерий в составе высушенных препаратов. Более того, маркетологи еще и пытаются выгодным образом позиционировать свой товар: был создан целый миф о якобы необходимых высочайших титрах заквасок. Очевидно, что приём лекарств в дозах, превышающих рекомендуемые приводит к передозировке, которая может оказаться смертельной. Так и итогом внесения неоправданно высокого количества действительно активных бактерий, особенно при консервировании высокоуглеводного сырья, может явиться переокисленный силос.

Реальная угроза для здоровья коров может возникнуть в случае, если основная часть производимой молочной кислоты будет представлена D-формой.

### Почему Промилк можно высушивать?

Тем не менее, доставка жидких заквасок в отдаленные и труднодоступные регионы нашей необъятной страны, безусловно, затруднена. Поэтому одним из наиболее целесообразных решений в данной ситуации является использование высушенных заквасок на основе спорообразующих микроорганизмов.

Как уже было сказано, лактобактерии не обладают способностью к образованию спор. В то же время, спорообразующие бациллы, например, вид *Bacillus subtilis*, имеют в своем цикле развития покоящиеся структуры (споры) для длительного выживания в неблагоприятных

условиях. Споровые формы микроорганизмов характеризуются высоким уровнем термостабильности. Они делают клетку абсолютно защищенной от повреждений и позволяют микроорганизмам с успехом перенести высушивание. До наступления благоприятствующих прорастанию условий споры находятся в состоянии покоя на протяжении длительного периода времени.

Есть два типа бактериальных спор: экзоспоры (формируются снаружи бактериальной клетки) и эндоспоры (внутри клетки). Бактериальные эндоспоры, в отличие от экзоспор, невероятно выносливы. Способность к образованию эндоспор есть только у некоторых бактерий филума Firmicutes, в частности, у бактерий рода *Bacillus*.

Очевидно, что при лиофильном высушивании у *B. subtilis* сохраняется не только высокий уровень выживаемости, но и активности. Поэтому в компании БИОТРОФ разработан высокоэффективный консервант для силосования Промилк, который представляет собой размноженную чистую и лиофильно высушенную чистую культуру полезных спорообразующих бактерий *Bacillus subtilis* 111. Бактерии препарата (в отличие от лактобактерий) прекрасно переносят высушивание за счет способности к образованию эндоспор, быстро восстанавливая свою активность в силосе. Промилк обеспечивает эффективное подавление гнилостной микрофлоры, плесневых грибов и дрожжей за счет синтеза антимикробных пептидов. Поэтому закваска с успехом используется для консервирования трудноусвояемых культур (бобово-злаковых смесей, козлятника восточного, клевера, люцерны и др.), а также кукурузы.

### Чем Промилк отличается от других Bacillus?

Селекция штамма *Bacillus subtilis* 111, на основе которого создан Промилк, велась в направлении получения микроорганизма, который будет превосходить другие бактерии не только по таким целевым признакам, как скорость подкисления и антагонистическая активность, но и способность эффективно конкурировать с эпифитными обитателями.

При проведении полногеномного секвенирования штамма бактерии *B. subtilis* 111 на платформе MiSeq (Illumina, Inc.) был подробно описан механизм выживаемости бакте-



рий в силосе. Показано, что значительная часть генома приходится на долю генов, связанных с повышенной устойчивостью к неблагоприятным факторам внешней среды. Расшировка генома с использованием базы данных RAST продемонстрировала активацию 106 генов (рис. 1), отвечающих за адаптацию к неблагоприятным внешним воздействиям, включающим повышенное осмотическое давление, окислительный и токсический стресс, холодовый шок, снижение питательных веществ в силосе.

Одним из путей адаптации у штамма *B. subtilis* 111 к повышенному осмотическому давлению в среде является путь внутриклеточного синтеза глицин-бетаина при участии генов *BetA*, *BetB*, *BetT*, *BetC*. Глицин-бетаин-связывающий белок (*OpuAc*) является очень эффективным осмопротектором. Полученные данные свидетельствуют об уникальных характеристиках штамма, поскольку ранее этот механизм не обнаруживали у бактерий рода *Bacillus*. Это особенное свойство возникло у данного штамма в результате мутации в ходе естественной эволюции и было обусловлено необходимостью выживать в агрессивной среде.

**Абсолютная безопасность**

Большинство бактерий рода *Bacillus* (включая *B. subtilis*) широко распространены в окружающей среде. Их обнаруживают в почве, воде, воздухе и пищевых продуктах (зерновых, хлебобулочных изделиях, соевых продуктах, мясе, сыром и пастеризованном молоке). У данных микроорганизмов имеется многовековая история их безопасного использования для щелочной ферментации многих продуктов питания. Как следствие, они постоянно попадают в желудочно-кишечный тракт и дыхательные пути, засевая эти отделы. Количество *Bacillus* в пищеварительной системе животных, птиц и человека в норме может достигать 109 КОЕ/г, что значительно выше содержания *Lactobacillus*. В связи с этим, ряд исследователей рассматривают бактерии рода *Bacillus* как один из доминирующих компонентов нормальной микрофлоры пищеварительной системы без каких-либо доказательств того, что такие микроорганизмы могут вызы-

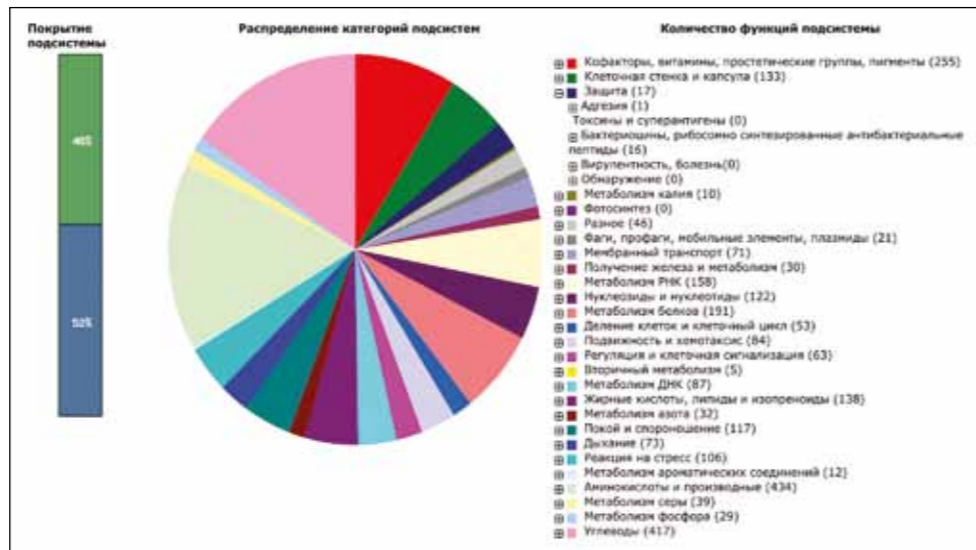


Рис. 2. Клеточный метаболизм штамма бактерии *B. subtilis* 111 на основе результатов функциональной аннотации генома с помощью базы данных RAST (https://rast.nmpdr.org). Круговая диаграмма представляет процентное содержание генов, связанных с различными метаболическими функциями.

вать заболевания (исключая виды *B. anthracis* и *B. cereus*) или оказывать какое-либо вредное воздействие на организм (Cartwright, 2009; Opinion of the Scientific Committee ..., 2005; Sanders et al., 2003).

На данный момент вид *Bacillus subtilis* считается одним из самых изученных и безопасных представителей рода бацилл. Это подтверждается Управлением по контролю качества продовольственных и лекарственных средств США (FDA), присвоившим виду статус GRAS (generally regarded as safe – «общепризнано как безопасное»). Штаммы этого вида широко используются в качестве пробиотика в России, странах Европы и США.

Тем не менее, хорошо известно, что безопасность бактерий связана не только с видовой принадлежностью, а с индивидуальными свойствами штаммов и серотипов (групп микроорганизмов одного вида, объединяемых по наличию или отсутствию свойств вирулентности). Поэтому мы придерживаемся принципа, что каждый штамм микроорганизма, несмотря на уже доказанную безопасность вида, к которому он принадлежит, должен дополнительно оцениваться в индивидуальном порядке для подтверждения пригодности его для использования в качестве биопрепарата. На сегодняшний день существуют современные молекулярно-генетические методы для надежной идентификации *B. subtilis*, включая расшифровку всего генома. Тестирование, проведенное с использованием метода ПЦР, еще раз дока-

зало отсутствие в геноме *B. subtilis* 111 каких-либо генов вирулентности и синтеза токсинов (рис. 2).

Результаты исследований, полученные методом полногеномного секвенирования также свидетельствовали о безопасности данного штамма. При исследовании *B. subtilis* 111 in vitro на наличие гемолитической активности на кровяном агаре мы не наблюдали зон просветления вокруг колоний, что также свидетельствовало об отсутствии синтеза гемолизина (токсина *B. cereus*) в культуре. Дополнительные эксперименты на животных (в частности, проверки на острую и хроническую токсичность) показали, что введение животным бактерий *B. subtilis* 111 даже в высоких дозах не приводило к каким-либо неблагоприятным последствиям. Данные об отсутствии токсичности данного штамма соответствовали данным о профиле безопасности *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*. Поэтому проведенный спектр широких исследований позволяет не сомневаться в абсолютной безопасности штамма в составе закваски Промилк.

**Более эффективная альтернатива**

С целью дать объективную оценку эффективности действия силосной закваски Промилк мы провели сравнение биохимических показателей качества кормов, изготовленных с данным препаратом, с результатами анализа качества силосов, заложенных с еще двумя консервантами: Консервантом 1

Таблица. Результаты анализа эффективности силосных консервантов в племенном заводе Ленинградской области в 2022 г. (по данным BLGG)

Закваска	Корм	Дата укоса	СВ, %	рН	NH <sub>3</sub> фракция	Органические кислоты			Индекс силосования	Индекс консервации	Индекс чувствительности к нагреву
						Уксусная/пропион.	молочная	масляная			
Нормативные показатели			30-50	3,7-4,4	<10	10-21	50-90	<3,0	95-105	80-100	1-20
Консервант 1 Траншея1	злаков. тр.	11.06.22	24,3	4,1	10	26	98	0,6	100	99	7
Консервант 1 Траншея2		19.06.22	25,6	4,1	10	22	68	<0,1	78	97	11
Промилк	злак. + клевер	17.06.22	23,8	3,9	10	23	83	<0,1	82	98	10
Консервант 2		21.06.22	25,9	4,0	8	20	73	<0,1	79	96	13

(пробы из 2-х траншей) и Консервантом 2. Консервант 1 — это импортная закваска на основе высушенных лактобактерий, Консервант 2 — смесь, состоящая из штаммов различных бактерий и ферментов. Все силоса были заготовлены практически одновременно в одном из племенных заводов Ленинградской области. Анализ показателей качества специалистами хозяйства проводили в европейской компании Еврофинс Агро Тестинг (BLGG) по методикам, признанным во всем мире (табл.).

Содержание сухого вещества (СВ) заготавливаемой растительной массы не соответствовало рекомендациям, что с высокой долей вероятности могло привести к повышению рН силоса и вторичной ферментации (табл.). Судя по эффективному подкислению корма на протяжении процесса ферментации, применение биоконсерванта Промилк обеспечивало наилучший процесс брожения по сравнению с другими консервантами. Известно, что от скорости подкисления растительной массы напрямую зависит качество готового корма.

Применение закваски Промилк позволило получить корм, свободный от масляной кислоты. При этом в одной из траншей, заложенной с дорогостоящим Консервантом 1, напротив, произошло накопление масляной кислоты в количестве, превышающем верхнюю границу нормы в 2 раза, что говорит о развитии в таком корме протеолитических клостридий, разлагающих протеин. Это может приводить к снижению пита-

тельной ценности корма, увеличению содержания растворимых форм азота, которые быстро ферментируются в рубце до аммиака. Происходит также и образование токсичных, дурно пахнущих биогенных аминов, что отрицательно влияет на поедаемость корма и здоровье животных.

Индекс чувствительности к нагреву дает информацию о том, будет ли заготовленный корм иметь способность к разогреванию в результате деятельности дрожжей и плесневых грибов или нет после открытия траншей. Считается, что при значениях индекса выше 50 — очень низкую стабильность, при значениях индекса выше 50 — очень низкую. Как видно из таблицы, все заготовленные корма имели очень высокий уровень аэробной стабильности.

**Успешный пример импортозамещения**

Сейчас на рынке представлено большое количество зарубежных препаратов на основе лактобактерий, но не все они так уж эффективны. Дело в том, что лактобактерии не образуют спор и очень трудно поддаются лиофильному высушиванию. После сушки часть бактерий либо полностью утрачивает жизнеспособность, либо восстанавливается, но при этом имеет поврежденные мембраны или ДНК, в результате чего бактерии не могут эффективно работать в силосе. Этот факт даже породил целый миф о якобы необходимых высочайших титрах заквасок. Закваска Промилк

создана на основе бактерии *Bacillus subtilis*, которая образует высокоустойчивые покоящиеся споры и имеет в геноме уникальные гены осмоустойчивости, что позволяет ей с успехом переносить высушивание без потери ценных свойств. Благодаря этому мы смогли получить сухую форму продукта, которая более удобна для транспортировки, не требует хранения в холодильнике и может доставляться в труднодоступные и удаленные регионы, а также имеет более длительный срок хранения (24 месяца), чем жидкие и большинство сухих препаратов. При этом бактерии очень быстро восстанавливают свою активность при внесении в силосную массу.

**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