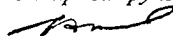


На правах рукописи



Лаптев Георгий Юрьевич

**РАЗРАБОТКА БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ
ПИТАТЕЛЬНОСТИ И ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
КОРМОВ**

03.00.23. - Биотехнология

06.02.02. - Кормление сельскохозяйственных
животных и технология кормов

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук



Дубровицы Московской области

2009 г.

Работа выполнена в лаборатории зоологической микробиологии
Государственного научного учреждения
«Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной
микробиологии Россельхозакадемии»

Научный консультант: доктор сельскохозяйственных наук, профессор
академик Россельхозакадемии Лев Константинович Эрнст.

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук Ирина Александровна Архипченко,
доктор биологических наук Тимур Яшарович Вахитов,
доктор сельскохозяйственных наук Николай Григорьевич Первов.

Ведущая организация: Государственное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии
и питания сельскохозяйственных животных Российской академии
сельскохозяйственных наук»

Защита состоится «29» декабря 2009 года, в 10 час., на заседании Совета по
защите докторских и кандидатских диссертаций Д.006.013.01 при Государственном
научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт
животноводства Российской академии сельскохозяйственных наук»

Адрес института: 142132, Московская обл. Подольский район, п. Дубровицы,
ВНИИЖ, т/факс (4967)65-11-01.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ ВНИИ животноводства
Россельхозакадемии.

Автореферат разослан «18» ноября 2009 г.

Учёный секретарь
Совета Д 006.013.01  В.П.Губанова

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИССЕРТАЦИИ

Актуальность темы

Современное состояние отечественного животноводства определяется состоянием кормовой базы и особенно качеством кормов. Экономические исследования и практический опыт показывают, что именно этот показатель определяет успех производства животноводческой продукции.

Повышение качества кормов, их переваримости, рационального использования являются самой насущной задачей практики современного животноводства. Возможности повышения продуктивности различных видов животных, птицы и аквакультуры на основе повышения усвоения питательных веществ кормов могут быть реализованы за счет использования новых биологически активных препаратов. Разработка таких препаратов заключается в выделении и изучении новых штаммов микроорганизмов, генетико-селекционной работе с ними, а также исследованиях, в ходе которых подбираются наиболее эффективные режимы культивирования данных штаммов, что завершается созданием конкретной препарата.

Наиболее эффективными путями использования микробиологических препаратов в животноводстве является создание препаратов-пробиотиков на основе микроорганизмов, чаще всего выделенных из желудочно-кишечного тракта животных или разработка препаратов для консервирования кормов.

Основой эффективного применения микробиологических препаратов на основе живых микроорганизмов можно считать интродукцию микроорганизмов в естественные экосистемы (силос, рубец жвачных животных, кишечник моногастрических и жвачных животных). Именно состояние экосистемы определяет эффективность применения того или иного препарата, поскольку интродуцируемый микроорганизм может быть легко потерян в результате конкуренции или естественного отбора.

Исходя из важной биологической роли симбиотических взаимодействий, возникших в ходе эволюции, следует считать неопенимым вклад микроорганизмов желудочно-кишечного тракта в систему пищеварения, с осуществлением ими ферментативной переработки труднодоступных комплексов кормов, наряду с осуществлением защиты организма животного-хозяина от патогенных микроорганизмов. Роль симбиотической микрофлоры велика и как дополнительного источника высокоценных комплексов липопротеидов, витаминов, других биологически активных соединений для организма животного-хозяина (Hungate, 1966, Fuller, 1989).

К настоящему времени установлено, что по эффективности применения пробиотики не уступают антибиотикам кормового и ветеринарного назначения, не оказывая при этом побочного действия на организм животного и микрофлору желудочно-кишечного тракта, являясь экологически чистыми (Панин, Малик, 1999).

Цель и задачи исследований

Целью настоящей работы являлось получение современных препаратов ферментно-пробиотического действия и биоконсервантов кормов, использование которых в цепочке корм →пищеварительный тракт →организм может способствовать повышению интенсивности производства животноводческой продукции. Для выполнения поставленной цели было необходимым разработать

теоретические основы интродукции бактерий в естественные экосистемы, которые являются частью организма сельскохозяйственного животного-хозяина или кормовыми источниками для животных. В задачи исследований входило:

- обоснование физиологических и биохимических последствий интродукции;
- создание коллекции бактерий и изучение их свойств с целью их дальнейшего использования как основы биопрепаратов для биоконсервантов и ферментативных пробиотиков;
- проведение экспериментального поиска полезных штаммов микроорганизмов, имеющих высокую целлюлозолитическую активность, разработка технологии промышленного культивирования микроорганизмов, с целью производства биопрепаратов, получения опытных партий препаратов и проведения их испытаний и практического использования;
- научно-производственная апробация препаратов ферментно-пробиотического действия целлобактерина и целлобактерина-Т на жвачных и моногастричных животных, птицах, рыбах; поиск, апробирование и производственное использование биоконсервантов силоса, кормов из подвяленных трав, зерносенажа, плющеного зерна на основе высокоэффективных штаммов гомо- и гетероферментативных молочнокислых бактерий,
- по результатам комплексных исследований, полученных в опытах на различных видах животных, определить наиболее эффективные и технологичные штаммы и оптимальные нормы ввода препаратов, созданных на их основе;
- определить экономическую эффективность использования полученных препаратов;
- на основании материалов, полученных в экспериментах, разработать и предложить производству рекомендации, наставления по рациональному и эффективному использованию изученных нами препаратов.

Научная новизна

Научная новизна исследований заключается в разработке теоретических и практических основ использования современных технологичных препаратов ферментно-пробиотического действия и консервантов кормов с определением оптимальных норм их ввода.

Впервые сформулировано положение о том, что у клинически здоровых животных, вследствие конкуренции между целлюлозолитическими микроорганизмами рубца, переваривание клетчатки не связано с дефицитом целлюлаз в рубце.

Впервые разработаны и внедрены в производство ферментативные препараты на основе бактериальных целлюлаз, механизм действия и параметры которых принципиально отличаются от целлюлаз грибного происхождения. Установлена возможность существования синергетических взаимодействий между целлюлазами грибного и бактериального происхождения, что важно в связи со стратегией применения ферментов в животноводстве.

Впервые за счет использования спорообразующих бактерий-продуцентов целлюлаз разработаны приемы введения ферментативной активности в гранулируемые и экспандируемые корма.

Впервые разработан биологический препарат для консервирования кормов (Биотроф-III) не на основе молочнокислых бактерий, а на основе спорообразующих аэробных бацилл.

Впервые при применении целлюлоза разработаны комбикорма для форели без включения в них рыбной муки.

Установлено биологическое влияние указанных выше препаратов на переваримость и использование питательных веществ кормов, эффективность их использования животными, особенности обмена веществ по ряду биохимических показателей крови, и продуктивность.

Автором получены 4 патента на изобретения по разработке препаратов для консервирования зеленых кормов и использованию микробных препаратов в животноводстве.

Практическая ценность

Практическая значимость выполненной работы заключается в том, что на основании проведенных исследований разработаны, теоретически и практически обоснованы и предложены производству новые технологии силосования зеленых кормов с применением новых биологических, экологически чистых препаратов микробного происхождения. Их использование в рационах животных, птицы, аквакультуры (рыбы) способствует улучшению использования питательных веществ, позволяет повысить их продуктивность, снизить затраты кормов на единицу продукции.

Созданы коллекции целлюлозолитических микроорганизмов из рубца крупного рогатого скота, лосей, овцебыков, верблюдов, коллекции гомоферментативных и гетероферментативных молочнокислых бактерий. Из этих коллекций отобраны наиболее перспективные штаммы, которые были использованы для создания препаратов. Изучение характеристик и биохимических свойств этих штаммов позволило в дальнейшем отработать оптимальные режимы производства препаратов. Составлена научно-техническая документация (лабораторные и технологические регламенты, технические условия и наставления по применению), утвержденная в установленном порядке (Целлобактерин –ТУ 9291-007-50932298-2997, Целлобактерин-Т – ТУ 9384-004-50932298-05, Биотроф – ТУ 9291-002-50932298-04, Биотроф-600 – ТУ 9291 50932298, Биотроф-111 – ТУ 9291 006-50932298-2007).

Реализация результатов исследований

Материалы исследований использованы при разработке научно-технической документации для выпуска указанных препаратов (технологические регламенты, технические условия и наставления по применению), а также методических рекомендаций и инструкций по применению микробиологических штаммов и препаратов в кормлении сельскохозяйственных животных и птицы и рыб, по применению их в силосовании кормов.

Кроме того, полученные результаты были использованы при проектировании производства ООО «Биотроф». По данному проекту в 2008 г. было построено и было введено в эксплуатацию предприятие, которое в настоящее время вышло на проектную мощность.

Апробация. Материалы диссертационной работы были доложены Всероссийских и международных конференциях, проводимых РАН, РАСХН, а также в ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, ГНУ ВНИИЖ, научно-производственных семинарах ООО «Биотроф», производственно-экономических совещаниях сельхозпредприятий России.

Внедрение. Результаты исследований внедрены в практику силосования кормов и кормления крупного рогатого скота и свиней, птицы и рыб в

специализированных хозяйствах Ленинградской, Московской, Брянской областей, Татарстана и других регионов России. Исследования послужили основанием для включения препарата целлюлобактерина в комбикорма для сельскохозяйственных животных, птицы и рыбы.

Основные положения, выносимые на защиту:

- положение о том, что у клинически здоровых животных вследствие конкурентных отношений между целлюлозолитическими микроорганизмами рубца, переваривание клетчатки не связано с дефицитом целлюлаз в рубце;
- обоснование эффективности и экономической целесообразности использования в животноводстве; современных высокоэффективных препаратов: ферментативных пробиотиков с целлюлазной активностью – целлюлобактерина и целлюлобактерина-Г;
- обоснование эффективности и экономической целесообразности использования в кормопроизводстве; современных высокоэффективных биопрепаратов для консервирования кормов:– Биотроф, Биотроф-111 и Биотроф-600;
- рекомендации для внедрения в сельскохозяйственное производство разработанных, апробированных в экспериментах рецептов и доз препаратов.

Публикации. Результаты исследований опубликованы в периодических центральных журналах, трудах и научных выпусках, сборниках конференций, симпозиумов по применению микробных препаратов для силосования кормов и их использованию в животноводстве и птицеводстве. Всего по теме диссертации опубликовано более 70 публикаций.

Объем и структура диссертации. Основной текст диссертация изложен на 354 странице компьютерной верстки и состоит из введения, обзора литературы и его заключения, материалов и методов исследований, результатов собственных исследований, заключения, обсуждения, выводов, предложений производству и списка литературы. В диссертации 145 таблиц, 29 рисунков и графиков. Список использованной литературы включает 219 наименований работ отечественных и зарубежных авторов.

2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Экспериментальная работа по диссертационной схеме была одной из разделов тематического плана ГНУ Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии в период 1982- 2008 гг.

Микробиологические, биохимические, гематологические и другие лабораторные исследования с различными штаммами микроорганизмов в лабораториях ГНУ ВНИИСХМ Россельхозакадемии проводились одновременно с проведением испытаний и научно-хозяйственными опытами на животных крупного рогатого скота, свиней, овец, птицы и рыбы.

Материалом для проведения микробиологических исследований служили штаммы бактерий *Lactobacillus plantarum* и *L. buchneri*, *Bacillus pantothenicus* и *B. subtilis*, целлюлозолитические ассоциации бактерий, выделенные из естественных источников (содержимое рубца и кишечника животных, силоса, плющеного зерна, эпифитной микрофлоры растений). Также в работе использованы в качестве тест-объектов штаммы микроорганизмов, главным образом, из коллекции ГНУ ВНИИСХМ, а также из некоторых других коллекций.

В экспериментах по определению токсигенных и патогенных свойств

изучаемых штаммов были использованы лабораторные животные – белые мыши из питомника РАМН «Рапполово» Ленинградской области.

Для определения количества жизнеспособных микроорганизмов в твёрдых и жидких средах, пользовались стандартным методом высева десятикратных разведений исследуемого материала на плотные питательные среды (метод Коха) («Практикум по микробиологии», 1976).

Морфологию изолятов бактерий изучали в суточных культурах, полученных на средах, при помощи светового микроскопа, в препарате «раздавленная капля», определяя при этом подвижность микроорганизмов, и их размеры. Кроме этого проводили окрашивание фиксированных нагреванием мазков по Граму.

Рост штаммов изучали на таких питательных средах, как мясопептонный бульон, мясопептонный агар, целлюлозный агар Омелянского №19.

О способности микроорганизмов ферментировать глюкозу и сахара длинного диагностического ряда судили по изменению цвета питательных сред с индикатором, а также по образованию газа.

Полученные данные использовали для проведения родовой идентификации отобранного штамма, при этом пользовались определителем бактерий Берги (под ред. Дж. Хоупа, 9-е изд., 1997). Вид определяли, руководствуясь частотной матрицей и методикой, предложенными Беркли с соавт. (Berkeley et al., 1984).

Целлюлозолитическую активность штаммов, отобранных из коллекции ГНУ ВНИИСХМ, определяли по методу Хендерсона, Хорвата и Блока в модификации Чюрлиса (Чюрлис, 1958; Тараканов, 1977). Показателем целлюлозолитической активности тест-штаммов служила величина изменения веса целлюлозы, выражаемая в процентах от её исходного значения.

Полученные результаты обрабатывали методами стандартной статистики, в результате чего находили наиболее вероятное значение количества микроорганизмов, содержащихся в 1,0 г исходного субстрата, при уровне достоверности $P_{0,95}$. (Лакин, 1980).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования и научно-хозяйственные опыты были проведены в соответствии со схемой.

3.1. Разработка методов контроля за интродуцируемыми штаммами в условиях естественной экосистемы.

Необходимой частью работы было выявление интродуцируемых штаммов в экосистеме желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственных животных и надёжный и быстрый метод, позволяющий отличать интродуцируемые штаммы от резидентных бактерий того же вида. Эти вопросы были отработаны на модельном объекте – кишечной палочке – *Escherichia coli* K12, которая используется в исследованиях по генетике и является обитателем кишечника теплокровных животных. Кроме того, во ВНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов были созданы штаммы кишечной палочки, продуцирующие незаменимые аминокислоты треонин и лизин.

Для быстрого выделения клеток интродуцируемых штаммов, продуцирующих треонин, VL492 и VL658 были получены спонтанные мутанты, обозначенные нами как соответственно ЗМ1 и ЗМ2, которые отличались от

исходных штаммов устойчивостью к налидиксовой кислоте (уровень устойчивости 20 мкг/мл). Такая мутация не распространена среди грамотрицательных бактерий и не связана с плазмидами. Низкий уровень мутирования кишечной палочки к устойчивости к налидиксовой кислоте обеспечивает эффективное обнаружение одной устойчивой клетки из 10^8 - 10^9 чувствительных клеток.

Суспензию клеток выращенной культуры данного штамма на селективной среде клеток выпаивали пороссятам в возрасте от 1 недели до 40 дней. Через каждые сутки, после однократного выпаивания, исследовали образцы экскрементов на наличие там клеток штамма ЗМ1. Определение числа клеток штамма ЗМ1 в экскрементах проводили по устойчивости клеток данного штамма к налидиксовой кислоте. О наличии плазмиды рYN7 с генами синтеза треонина судили по устойчивости выделенных клеток к ампициллину или пенициллину. Через сутки после скармливания пороссятам культуры ЗМ1, устанавливали появление в экскрементах клеток *E. coli*, устойчивых к налидиксовой кислоте. Определенная часть клеток несла устойчивость к ампициллину, которая контролируется плазмидой рYN7. Доля клеток штамма ЗМ1 в экскрементах составляла в первый день до 20% от общего количества клеток кишечной палочки. В последующие дни количество клеток ЗМ1 быстро снижалось и после 3-4 суток их не удавалось обнаружить. Таким образом, уже в опытах на свиньях подтверждается тот факт, что штамм ЗМ1, как и другие штаммы *E. coli* K12, не способны длительное время размножаться в условиях кишечника.

В работе также был использован штамм *Escherichia coli* K12, продуцирующий лизин VL613, полученный во ВНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов. У этого штамма был получен такой же мутант, и он был обозначен как ЗМ4. Изучение выживаемости клеток в кишечнике поросят различных возрастов показало, что штамм ЗМ; может сравнительно долго существовать в кишечнике поросят в достаточно высоких концентрациях по сравнению с другими штаммами.

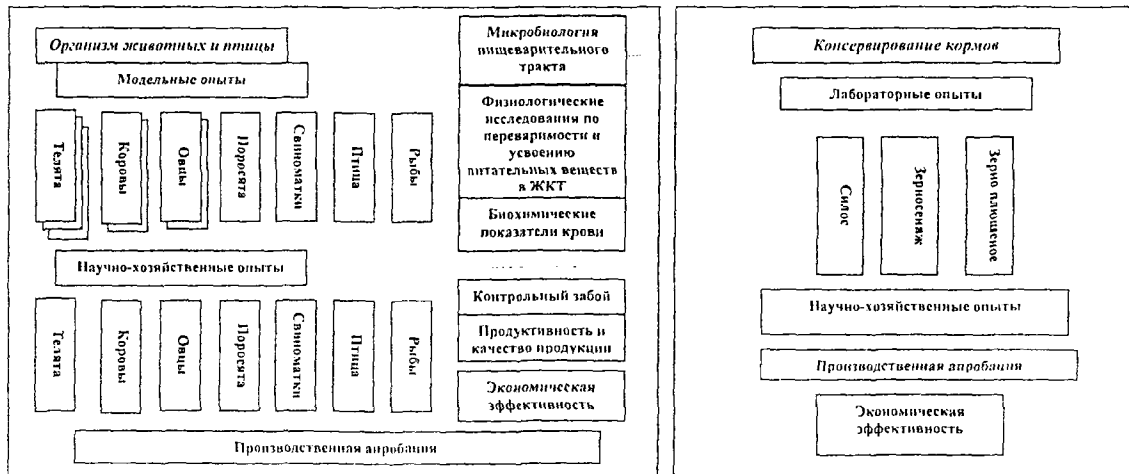
В связи с этим было изучено действие этого штамма на организм поросят в условиях рациона, дефицитного по лизину. Для проведения эксперимента на основе этого штамма были наработаны опытные партии препарата. Титр препарата составлял 2,2 млрд. кл/мл. Препарат характеризовался: сухое вещество - 2,31%, сырой протеин в сухом веществе - 58,4%, в том числе лизин - 2,5%.

Опыты по кормлению поросят были проведены в учебно-опытном хозяйстве Юленурме Эстонской сельскохозяйственной академии (г.Тарту, Эстония). Опытные группы были укомплектованы из 3-месячных поросят со средней живой массой 25 кг по принципу аналогов. Рационы животных были составлены по сравнению с нормой кормления, с дефицитом 20% сырого протеина и 20-25% лизина. Для покрытия дефицита в лизине пороссятам 1 группы давали 5 мл препарата. Рацион поросят 2 группы был аналогичен рациону поросят 1 группы, но дефицит в лизине был покрыт за счет концентрата промышленного лизина. Рацион свиней 3 группы был сбалансирован рыбной

ОБЩАЯ СХЕМА ИССЛЕДОВАНИЙ

Создание биологических препаратов для повышения качества и переваримости кормов

Поиск эффективных штаммов микроорганизмов для сельскохозяйственных животных и птицы, а также для консервирования кормов растительного происхождения



Рекомендуемые системы использования эффективных штаммов микроорганизмов в кормлении и кормопроизводстве

мукой. После периода адаптации на второй месяц опыта среднесуточный прирост свиней 1 группы превышал прирост свиней 2 группы, но был ниже, чем в 3 группе.

Аналогично и на третий месяц опыта среднесуточный прирост свиней в 1 группе был больше, чем во 2 группе (+35 г), но меньше, чем в третьей группе (-25 г). В среднем за опыт (92 кормодня) в 1 группе (добавление ЗМ4) среднесуточный прирост составил 498 г.,

при затратах 4,7 кормовых единиц и 407,6 г переваримого протеина на 1 кг прироста. Во 2 группе (добавление лизина) среднесуточный прирост живой массы составил 480,0 г, на 1 кг прироста было затрачено 4,9 к. ед. и 422,4 г переваримого протеина.

Зоотехническая эффективность этого же штамма в составе полнорационного комбикорма для поросят (с 60 до 90 дневного возраста) была изучена в экспериментальном хозяйстве ВНИИ животноводства РАСХН «Кленово-Чегодаево».

Поисковый научно-хозяйственный опыт был проведен на поросятах-отъемышах, сформированных по принципу аналогов в 2 группы по 6 голов в каждой. Поросята контрольной группы получали комбикорм с премиксом, рекомендуемым для данной возрастной группы поросят. Животным опытной группы скармливали в составе того же комбикорма премикс того же состава, но обогащенный сухой бактериальной культурой ЗМ4 из расчета 20 мг сухой бактериальной культуры на голову в сутки или 13 г на тонну комбикорма.

В течение опыта поросятам обеих групп скармливали одинаковое количество комбикорма. Однако содержание лизина находилось на самом нижнем уровне его нормы, предусмотренном ОСТ-8-20-77 на постстартерные комбикорма для поросят. Условия кормления и содержания животных были одинаковыми, среднесуточное потребление комбикормов было практически одинаковым (контроль – 1,45, в опытной группе – 1,48 кг на голову)

Среднесуточный прирост поросят контрольной группы, получавших комбикорм без добавки, составил 550 г; при скармливании того же комбикорма, обогащенного испытуемым препаратом на основе штамма, продуцирующего лизин, среднесуточный прирост у поросят опытной группы возрос до 623 г или увеличился на 13,3% по сравнению с приростами поросят контрольной группы.

Более высокая интенсивность роста поросят опытной группы обусловлена лучшим использованием животными опытной группы комбикорма. Так, у животных контрольной группы затраты комбикорма на 1 кг прироста живой массы составили 2,64 кг, у поросят опытной группы – 2,38, или на 9,8% меньше, чем в контрольной, при 100% сохранности. Проведенные исследования показали, что обогащение полнорационного комбикорма для поросят послеотъемного периода выращивания препаратом на основе штамма VL613, продуцирующего лизин, повышает его продуктивное действие, при снижении затрат корма на единицу прироста.

Таким образом, результаты эксперимента показывают, что используя штамм ЗМ4, как производное *E. coli* VL613, можно компенсировать 20-25% дефицита лизина в рационе. Однако неясно, является ли это следствием того, что этот штамм действительно синтезирует лизин в кишечнике или же это следствие его неспецифического воздействия на микрофлору.

3.2. Интродукция микроорганизмов в естественную экосистему рубца - способ повышения эффективности использования кормов.

3.2.1. Анализ целлюлазной активности содержимого рубца КРС.

Целлюлозолитические микроорганизмы рубца представлены как бактериями, так и грибами-хитридиомицетами. При лабораторном изучении переваривания целлюлозосодержащих субстратов (фильтровальной бумаги и ячменной соломы) было установлено, что нативная рубцовая жидкость разлагала значительное количество навески субстрата. В табл.1 приведены результаты изучения действия популяций микроорганизмов рубцовой жидкости на микробиологическое разложение фильтровальной бумаги и соломы без антибиотиков и с антибиотиками.

Из таблицы следует, что добавление пенициллина и стрептомицина привело к снижению переваривания обоих субстратов. Вместе с тем добавление нистатина не сказалось на разложении фильтровальной бумаги, тогда как количество переваренной соломы в этом случае было значительно ниже, чем в случае без добавления антибиотиков. Совместное добавление всех трех антибиотиков прекращало переваривание обоих субстратов, что свидетельствовало об отсутствии активности целлюлаз каких либо других организмов.

Таблица 1.

Действие *Ruminococcus albus 1-33* на разложение субстратов популяциями бактерий и грибов рубца

| Вариант опыта | Разложено субстрата в % к массе исходной навески | |
|---|--|-----------|
| | Фильтровальная бумага | Солома |
| Рубцовая жидкость | 26,8±1,15 | 33,3±2,00 |
| Рубцовая жидкость + <i>R. Albus 1-33</i> | 32,6±2,15 | 28,0±4,0 |
| Рубцовая жидкость + пенициллин и стрептомицин | 20,0±0,00 | 28,0±0,00 |
| Рубцовая жидкость + нистатин | 31,0±1,15 | 22,0±2,00 |
| Рубцовая жидкость + нистатин + <i>R. albus 1-33</i> | 38,4±2,42 | 22,0±2,15 |
| Рубцовая жидкость + пенициллин, стрептомицин и нистатин | 0 | 0 |

Из таблицы 1 также видно, что вклад грибов в переваривание соломы значительно выше, чем в переваривание фильтровальной бумаги. Суммарное количество субстрата, разложенное бактериями (вариант с добавлением нистатина) и грибами (вариант с добавлением пенициллина) было достоверно выше количества субстрата, переваренного нативной рубцовой жидкостью (вариант без добавления антибиотиков, $P < 0,99$). Таким образом, каждая группа целлюлозолитиков утилизирует больше субстрата в отсутствие другой группы. Следует отметить, что в экологии увеличение потребления субстрата популяцией одного вида в отсутствие популяции другого вида считается одним из признаков конкурентных отношений между ними (Connel, 1983, Schoener, 1983).

Конкурентные отношения, безусловно, затрудняют прямое определение доли субстрата перевариваемого бактериями или грибами в естественных условиях. Использование двухфакторного дисперсионного анализа позволяет вычислить силу действия популяций бактерий или грибов на переваривание субстрата (рис.1).

Нами изучен вопрос о том, как влияет добавление к рубцовой жидкости дополнительного количества целлюлозолитических бактерий *Ruminococcus albus*, входящих в состав целлюлозолитической ассоциации 1-33. К исходному содержимому рубца, которое включало 3 млн/мл клеток бактерий-целлюлозолитиков, была добавлена культура с содержанием *R. albus* 0,45 млрд/мл.

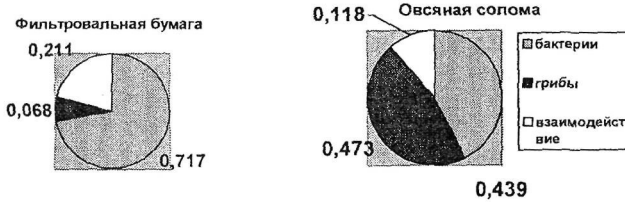


Рис. 1 Доля бактерий и грибов рубца в переваривании целлюлозосодержащих субстратов.

Таким образом, численность целлюлозолитических бактерий была увеличена более чем в 100 раз. Из таблицы 1 видно, что добавление бактерий повысило целулазную активность (определяемую по разложению фильтровальной бумаги), но не увеличило количество переваренной соломы. Даже при подавлении грибов не происходило увеличения перевариваемого субстрата. Таким образом, увеличение численности целлюлозолитических микроорганизмов не привело к увеличению переваримости

Мы предположили, существование конкурентных отношений между популяциями бактерий и грибов рубца. В классической математической экологии для описания конкурирующих популяций используется система из двух дифференциальных уравнений – уравнения Лотки-Вольterra:

$$\frac{dN_1}{dt} = r_1 N_1 \frac{K_1 - N_1 - N_2 \alpha_{12}}{K_1}$$

$$\frac{dN_2}{dt} = r_2 N_2 \frac{K_2 - N_2 - N_1 \alpha_{21}}{K_2}$$

где N_1 – плотность популяций грибов, N_2 – плотность популяций бактерий, K_1 – плотность насыщения популяции грибов при подавлении бактерий, K_2 – плотность насыщения популяций бактерий при подавлении грибов, r_1 и r_2 – максимальные удельные скорости увеличения популяций, α_{12} – коэффициент конкуренции, характеристика популяции бактерий. Отражающая меру ее конкурентного давления на популяции грибов, α_{21} – аналогичная величина для популяций грибов.

Поскольку в работе изучали популяции микроорганизмов, значительно различающиеся друг от друга по своим размерам, жизненным циклам, активности, то был введен дополнительный коэффициент k , который не только переводит

численность популяций в соизмеримые единицы, но и учитывает различные способы определения численности популяций (определение титра бактерий и подсчет спорангиев на субстрате при микроскопировании).

Было рассчитано значение этого коэффициента для бумаги ($k = 4,2 \times 10^6$) и соломы ($k = 6,5 \times 10^6$). Он означает, что к 48 часам $6,5 \times 10^6$ бактерий переваривают такое же количество сухого вещества соломы, что и грибы, при численности, равной одному спорангию, обнаруживаемому при микроскопировании. Данный коэффициент позволяет приравнивать численность бактерий к численности грибов. Были экспериментально определены для фильтровальной бумаги $K_1 = 4,0$, $K_2 = 3,1 \times 10^7$, $N_1 = 2,1$, $N_2 = 2,0 \times 10^7$. Для соломы эти значения составили $K_1 = 10,0$, $K_2 = 6,5 \times 10^7$, $N_1 = 5,4$, $N_2 = 3,5 \times 10^7$. Существует способ определения α_{12} и α_{21} , разработанный Г.Ф.Гаузе (Гаузе, 1967) и основанный на том, что при достижении насыщающих концентраций популяций (то есть при прекращении их роста) $K_1 - N_1 - N_2\alpha_{12} = 0$ и $K_2 - N_2 - N_1\alpha_{21} = 0$. Было рассчитано, что для первого субстрата $\alpha_{12} = 0,377$, $\alpha_{21} = 1,138$. и для второго субстрата $\alpha_{12} = 0,460$, $\alpha_{21} = 0,462$.

Таким образом, α_{12} показывает степень подавляющего действия бактерий на грибы, а α_{21} степень подавляющего действия грибов на бактерий. Эти коэффициенты не равны нулю, что свидетельствует о существовании конкурентных отношений между целлюлозолитическими бактериями и грибами в рубце. Конкуренция отмечена в 527 экспериментах с 215 видами, или же в 90% экосистем ей подвержено 76% видов (Coppel, 1983, Schoener, 1983). По-видимому, рубец жвачных не является исключением в этом отношении, и они возможны между целлюлозолитическими микроорганизмами рубца. Это позволяет объяснить данные, приведенные в табл. 1. Понятно, что введение дополнительного количества целлюлозолитических бактерий не приводит к увеличению переваривания соломы.

На основании соотношений коэффициентов можно прогнозировать исход конкуренции вытекающей из уравнения Лотки-Вольтерра в зависимости от соотношения величин α_{12} и α_{21} .

На рис. 2. приведен пример, когда $K_1/\alpha_{12} > K_2$ и $K_2/\alpha_{21} > K_1$. Он приводит к следующему исходу: ни одна популяция не может сдерживать развитие другой – происходит устойчивое сосуществование популяций.

По оси абсцисс (N_1) отложена численность популяций грибов, выраженная в количестве спорангиев. По оси ординат (N_2) – численность популяций бактерий, выраженная в условных единицах (в пересчете на соответствующее количество спорангиев грибов через коэффициент k). Графики представляют собой геометрическое место точек, соответствующие равновесным состояниям популяций грибов и бактерий. Точка пересечения графиков говорит о возможности устойчивого сосуществования грибов и бактерий в содержимом рубца жвачных.

Понимая сложность применения уравнений Лотки-Вольтерра к естественным экосистемам, следует учитывать, что эти уравнения содержат ряд допущений. Однако в нашем случае данная модель основана на экспериментальных результатах, полученных в наших исследованиях, и была подтверждена в дальнейших экспериментах по скармливанию ассоциации 1-33.

Известно, что клетчатка корма в рубце переваривается не полностью. Ранее это увязывали с дефицитом целлюлаз. Исходя из полученных нами данных, а также данных других авторов (Akin, Rigsby, 1995), можно скорее говорить об определенном «избытке» потенциальной целлюлазной активности в рубце.

Сделанный нами вывод позволяет рекомендовать способ повышения переваримости клетчатки рациона у взрослых животных не путем использования ферментных препаратов на основе целлюлаз, а проводя технологическую обработку целлюлозосодержащих субстратов, повышая доступность целлюлозы для действия целлюлаз. Другим путем повышения переваримости клетчатки может быть создание препаратов, стимулирующих рост и развитие популяций целлюлозолитических микроорганизмов.

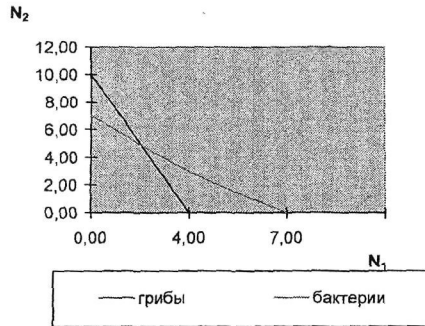


Рис. 2. Анализ возможности устойчивого сосуществования популяций грибов и бактерий в содержимом рубца на основе экспериментальных коэффициентов, рассчитанных согласно модели Лотки-Вольтерра.

2.2. Изучение целлюлазной активности ассоциации 1-33.

Было отобрано 5 наиболее активных ассоциаций 1-33, у которых сравнительно высокая скорость разложения клетчатки сочеталась с высокой целлюлазной активностью. Эти пять ассоциаций были подвергнуты более детальному микробиологическому исследованию и все они, при высеве, характеризовались наличием двух компонентов:

1. Клетки имеют форму кокков от 0,7 до 2,0 мк в диаметре. Единичные или в коротких цепочках. Спор нет. Грампозитивны. На МПА и МПБ не растут. Сбраживают целлюлозу, глюкозу, целлобиозу, лактозу, целлобиозу, фруктозу. Не сбраживают сахарозу, арабинозу, маннит, сорбит, мальтозу, рамнозу, дульцит. Растут на молоке и молоке с NaCl. Лакмусовое молоко через 24 ч восстанавливают, через 48 ч — подкисляют. Обладают целлюлазной активностью. Изолят был определен, как *Ruminococcus albus*.

2. Клетки имеют форму коротких палочек, которые встречаются поодиночке или собраны в короткие и длинные цепочки-нити, подвижны. Грампозитивны. Рост на МПА и МПБ отсутствует. Спор нет. Сбраживают глюкозу, арабинозу, целлобиозу, сахарозу, маннит, галактозу, мальтозу, раффинозу, фруктозу. Не сбраживают сорбит, дульцит и рамнозу. Каталазу не образуют. Растут на молоке и на молоке с добавлением 4-6% NaCl, желчи (20%, 40%), фенола (0,4%), лакмусовое молоко подкисляют. Они были определены как *Lactobacillus acidophilus*.

Один из вариантов, обозначенный нами как 3-7, выделенный из рубца лося и превосходящий ассоциацию 1-33 по целлюлазной активности был использован

для наработки опытных партий целлобактерина с целью проведения производственных испытаний.

Предварительное изучение влияния pH на скорость гидролиза растворимой КМ-целлюлозы под действием внеклеточных целлюлаз *R. albus* 1-33 показало, что оптимум pH реакции соответствует 6,4 - 6,6 и pH-профиль целлюлазной активности имеет достаточно симметричный колоколообразный вид (рис.3). (Условия: 40°C, 0,1М уксусно-ацетатный буфер, pH 4,0-6,4, 0,1М фосфатный буфер, pH 6,4-8,0, концентрация КМЦ – 4 г/л. Активность (А) дана в условных единицах). Следует отметить, что для большинства целлюлаз аэробных грибов pH сдвинут в кислую сторону 1,5 - 2 единицы. Все дальнейшие эксперименты проводили при pH 6,6. Активность бактериальных целлюлаз нормальным образом увеличивается с ростом температуры, и при 40 °С (близкой к температуре в рубце жвачных равной 39 °С) она в 7,2 раза выше, чем при 20° С. При повышении температуры происходит заметная инактивация целлюлаз, поэтому все последующие опыты, кроме тех в которых температуру варьировали, проводили при 40° С.

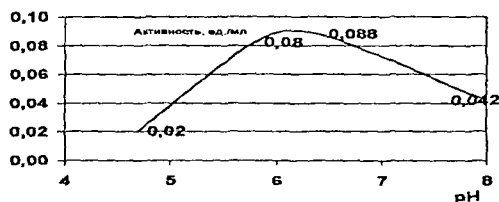


Рис. 3. Влияние pH на скорость гидролиза растворимой карбоксиметилцеллюлозы под действием эндоглюканазы *R. albus* 1-33.

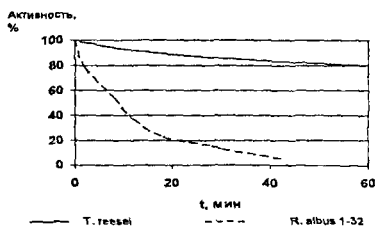


Рис. 4. Необратимая инактивация эндоглюканазы *R. albus* 1-33 при 60°C: при pH 6,6 активность определялась вискозиметрически по отношению к гидролизу КМЦ. Активность дана в %.

Целлюлазная (эндоглюканазная) активность культуральной жидкости ассоциации 1-33 оказалась низкой, значительно ниже активности культуральной жидкости аэробных грибов. Если активность внеклеточных целлюлаз *T. reesei*

составляет 10-30 ед/мл. культуральной жидкости, то активность культуральной жидкости ассоциации 1-33 после центрифугирования в течение 30 мин при 13 тыс. об/мин равнялась $0,098 \pm 0,003$ ед/мл. После более скоростного центрифугирования (2 ч. при 30 тыс. об/мин) она практически не изменилась, составляя $0,095 \pm 0,003$ ед/мл. Активность же самих бактериальных клеток, отмытых буферным раствором при pH 6,4 на холоде составила 30 ед/г в расчете на массу сухих клеток, что соответствует активности промышленных продуцентов.

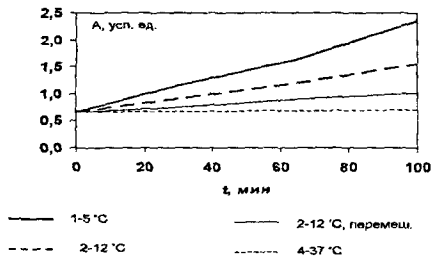


Рис.5. Влияние температуры на скорость выхода целлюлазы *R. albus* 1-33 в среду при инкубации в фосфатном буфере (0,1М, pH6,6).

Из полученных результатов следует, что штаммы целлюлозолитического компонента ассоциации не секретирует целлюлазу в культуральную среду.

На рис. 4. показана кривая термоинактивации КМЦ-активности целлюлозного комплекса *R. albus* 1-33 при 60°C. Для сравнения приведена соответствующая зависимость эндоглюканазы *T. reesei*. Из полученных результатов следует, что целлюлазы *R. albus* не отличаются высокой термостабильностью.

Изучение зависимости выхода целлюлазы из клеток в культуральную среду от температуры приведено на рис. 5. Установлено, что при инкубации клеток *R. albus* на холоде в течение 12 ч в ацетатном буфере с pH 6,6 в раствор переходит до 57% целлюлазы, тогда как при 37°C в течение 1,5 ч — до 97%. Если «экстракция» целлюлазы сопряжена с разрывом ковалентных химических связей (как при автолизе), то энергия активации составляет 12-20 ккал/моль (скорость процесса возрастает в 2-3 раза при повышении температуры на каждые 10°C). Если же выход целлюлазы связан с простой диффузией, то энергия активации составит 1-6 ккал/моль (скорость процесса возрастает в 1,06-1,4 раза при повышении температуры на каждые 10°C). Полученные результаты свидетельствуют о том, что «вымывание» целлюлазы буферным раствором, вероятно, обеспечивается диффузией. Тот факт, что при перемешивании процесс ускоряется, подтверждает предположение, что целлюлазы прикреплены к внешней поверхности клеточной стенки бактерий. Эти результаты соответствуют общепринятому положению, что у бактерий, в том числе и у *R. albus* целлюлазы объединены в целлюлосомы — структуру, расположенную на поверхности клеток.

Свойства целлюлаз, выделенных из других бактериальных изолятов были схожи с описанной выше целлюлазой.

3.3. Использование целлобактерина для молодняка крупного рогатого скота.

Проведены исследования по интродукции целлюлозолитической бактерии в рубец телят. В табл. 2. приведена схема эксперимента по применению целлобактерина телятам эстонской красной породы в опытном хозяйстве «Тарту» Института животноводства и ветеринарии (республика Эстония, Тарту). Результаты других опытов представлены в таблице 3. Результаты опытов (табл.3.) свидетельствуют о том, что действие препарата зависело от возраста телят. Статистически достоверное увеличение среднесуточных привесов по сравнению с контрольными вариантами (без скармливания препарата) были получены только во втором опыте – на телятах в возрасте 2,5 мес.

Таблица 2.

Схема опытов по скармливанию целлобактерина телятам в различном возрасте

| № опыта | Возраст телят, мес. | Группы | Число телят | Кормление в учетном периоде |
|---------|---------------------|--------|-------------|---|
| 1 | 1 | 1 | 7 | Основной рацион –1 (ОР-1) ОР-1 + целлобактерин |
| | | 2 | 7 | |
| 2 | 2,5 | 3 | 7 | ОР-2 |
| | | 4 | 7 | ОР-2 + целлобактерин |
| 3 | 4 | 5 | 10 | ОР-3 |
| | | 6 | 10 | ОР-3 + целлобактерин |

Статистически достоверных различий не было обнаружено в опытах 1 и 3 – на телятах в возрасте 1 и 4 мес. Мы полагаем, что именно в период 2-4 месяца происходит формирование микрофлоры рубца, и животное становится способным к эффективному усвоению клетчатки.

Таблица 3.

Затраты кормов и питательных веществ на одного теленка и среднесуточный прирост живой массы при скармливании целлобактерина

| Группы | Показатели | | |
|--------|---|--|---------------------------|
| | Живая масса в начале учетного периода, кг | Живая масса в конце учетного периода, кг | Среднесуточный прирост, г |
| 1 | 47,9 ±7,9 | 109,3±11,1 | 675 |
| 2 | 46,4±5,4 | 106,9±8,9 | 664 |
| 3 | 70,4±7,98 | 117,3±13,83 | 710 |
| 4 | 69,3±8,30 | 127,0±14,46 | 874 |
| 5 | 128,7±11,58 | 196,5±15,65 | 969 |
| 6 | 130,1±15,36 | 200,8±20,25 | 1010 |

В табл. 4 приведены результаты изучения переваримости клетчатки теленком в этот период. Как видно из таблицы, у животных, получавших препарат, практически все показатели, связанные с перевариванием клетчатки были выше. Отсутствие эффекта у животных в I опыте можно объяснить недостаточным развитием рубца в анатомо-гистологическом и физиологическом отношениях, не связанных с заселением рубца микроорганизмами. Как известно, основные структурные преобразования рубца, сетки и книжки в постнатальном онтогенезе завершаются лишь к концу третьего месяца.

В более старшем возрасте, на одних и тех же животных, были поставлены две серии опытов: первая – на животных в возрасте 3,5 мес., вторая – 4,5 мес. Основной рацион телят в первой серии состоял из комбикорма (1,8 кг) и сена лугового (2,5 кг), во второй серии - сена в том же количестве и кукурузного силоса (5,0 кг). Контрольная группа получала комбикорм в количестве 1,95 кг, опытная – 1,8 кг, для сбалансирования рациона по общей питательности и протеину. Добавление препарата приводило к статистически достоверному увеличению количества ЛЖК в рубце. Однако эффект был более четко выражен у животных младшего возраста (1 серия). Через 2 часа после кормления статистически достоверные различия между опытом и контролем были только в 1 серии опытов.

Полученные на телятах результаты подтверждают ранее сделанные заключения о целесообразности интродукции целлюлозолитических бактерий в период формирования экосистемы рубца (табл. 4).

Таблица 4.

Влияние целлюбактериана на переваримость клетчатки у телят.

| Показатели | Группы | |
|-----------------------------------|-------------|-------------|
| | Контрольная | опытная |
| Целлюлозолитическая активность, % | 20,0±0,0 | 30,5±1,7* |
| Потреблено, г | 406,4±86,5 | 515,0±7,8 |
| Переварено в желудке, г | 284,5±10,2 | 377,0±7,8* |
| Прошло в дуоденальном химусе, г | 121,9±10,2 | 128,1±1,61 |
| Переварено в кишечнике, г | 5,2±0,8 | 5,9±1,0 |
| Выделено с калом, г | 116,6±28,8 | 132,2±35,0 |
| Переварено, г | 289,9±58,5 | 382,9±27,2* |
| Коэффициент переваримости | 71,3 | 74,3 |

* p > 0,999

3.4. Использование целлюбактериана в свиноводстве

Для испытания целлюбактериана в свиноводстве было проведено два производственных опыта: 1-й – на поросятах-сосунах породы ландрас со дня рождения до отъема (42 дней), 2-й – на помесных поросятах (крупная белая х

ландрас) в возрасте от 2,5 до 4,5 мес. Результаты первого опыта представлены в табл. 5.

Таблица 5.

Влияние целлюлобактерина на рост поросят-сосунов

| Группа | Средняя живая масса | | Прирост живой массы, кг | Среднесуточный прирост живой массы, г |
|----------------------------|---------------------|------------|-------------------------|---------------------------------------|
| | При рождении | При отъеме | | |
| Контрольная | 1,10±0,09 | 7,54±0,70 | 6,44±1,04 | 153,3±25,7 |
| Опытная + целлюлобактерин: | 1,07±0,08 | 8,53±0,81 | 7,46±0,90 | 177,6±26,3 |

Результаты опыта показали, что среднесуточный прирост живой массы у животных, получавших препарат, был достоверно выше ($P>0,95$), препарат также способствовал лучшей сохранности поросят. Результаты второго опыта представлены в таблице 6.

Взвешивание проводили в начале и в конце опыта, а также один раз в месяц в середине опыта. Животные получали корма по типовым рационам хозяйства. Анализ рационов проведен на основании детализированных норм кормления сельскохозяйственных животных.

Таблица 6.

Схема опыта по испытанию целлюлобактерина на поросятах в возрасте от 2,5 до 4,5 мес.

| Группа | Число животных в группе | Кормление в учетном периоде |
|--------|-------------------------|--|
| 1 | 27 | Основной рацион (ОР) |
| 2 | 27 | ОР + 3 г препарата на голову в сутки в течение первых трех суток, далее – 15 г на голову 1 раз в 5 суток |
| 3 | 27 | ОР + 5 г препарата на голову в сутки, далее – по 25 г на голову 1 раз в 5 суток |

Результаты производственного опыта на 70 поросятах старшего возраста приведены в табл.7.

Таблица 7.

Действие препарата на поросят-отъемышей

| Показатели | Группы | | |
|--------------------------------|------------|------------|------------|
| | 1 | 2 | 3 |
| Живая масса в начале опыта, кг | 17,3±3,43 | 17,15±3,16 | 17,52±3,57 |
| Живая масса в конце опыта, кг | 35,66±5,51 | 41,45±7,23 | 42,72±6,13 |
| Прирост живой массы, кг | 18,36 | 24,30 | 25,20 |
| Среднесуточный прирост, г | 306,0±55,0 | 405,0±65,0 | 420,0±64,0 |
| Оплата корма, к.е. | 5,85 | 4,42 | 4,26 |

Данные опыта показывают, что применение препарата оказало положительное действие на животных. Во всех группах (2 и 3) среднесуточные приросты живой массы были достоверно выше чем, в контроле ($P > 0,95$), но при этом максимальные приросты были в 3 группе. Следует отметить, что при проведении опыта поросята всех групп были здоровы, хорошо поедали корма.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о высокой биологической эффективности препарата на поросятах и о целесообразности его применения в свиноводстве. Последующие исследования по использованию целлюлобактерина подтвердили полученные нами результаты.

3.5. Использование целлюлобактерина в птицеводстве.

Эффективность скармливания целлюлобактерина молодняку кур яичного направления (кросс Родонит) изучали на птицефабрике "Заводская" Ленинградской области (табл.8). Препарат вводили с кормом курочкам опытной группы с 1 по 60 день в количестве 1 г на голову 1 раз в 5 суток. Контрольная группа птицы не получала пробиотик. Поголовье курочек опытной группы составляло 26700, контрольной — 21755.

После 60-дневного возраста скармливание препарата прекратили до перевода птицы в цех промышленной несущки. В период перевода в рацион был включен целлюлобактерин в качестве антигистрессового препарата. Полученные в ходе опыта результаты представлены в табл. 8.

Таблица 8.

| Группы | Возраст 1-16 недель | | | Возраст 17-28 недель | |
|-------------|--------------------------|----------------------------------|--|----------------------|--------------------------|
| | Сохранность поголовья, % | Средне суточный прирост массы, г | Затраты корма на 1 кг прироста массы, кг | Яйценоскость, шт. | Затраты корма, кг/10 шт. |
| Контрольная | 96,9 | 10,8 | 4,8 | 124,2 | 1,51 |
| Опытная | 97,9 | 11,3 | 4,5 | 136,7 | 1,41 |

Скармливание целлюлобактерина способствовало повышению среднесуточных привесов и сохранности курочек в раннем возрасте, а в последующем, также увеличению яйценоскости кур на 10 %, при снижении расхода кормов на каждые 10 яиц на 6,6 % в первые шесть месяцев продуктивности.

Опыт, проведенный в экспериментальном хозяйстве ВНИИ гелетики и разведения сельскохозяйственных животных на бройлерах кросса ИЗА с суточного до 6-недельного возраста показал эффективность применения целлюлобактерина в кормлении бройлеров (табл.9). Цыплята контрольной и опытной групп получали основной рацион (ОР), зерновую основу которого составляла пшеница (более 50 %). В основной рацион цыплят опытной группы вводили целлюлобактерин по 1 г на голову 1 раз в пять суток (по 8 г на голову за весь период выращивания). Поголовье было одинаковым в контрольной и опытной группах - по 1050 цыплят. Анализ данных, представленных в табл. 8 показывает, что введение в корм цыплят-бройлеров целлюлобактерина способствовало увеличению сохранности поголовья в опытной группе по сравнению с контрольной на 2,5 %, среднесуточного привеса — на 10 % и снижению затрат корма на 6,7 %.

Таблица 9.

Основные результаты опыта на бройлерах

| Группы | Сохранность поголовья, % | Живая масса в 6 недель, г | Средне-суточный прирост массы, г; | Затраты корма на 1 кг прироста, кг |
|-------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| Контрольная | 92,5 | 1745 | 37,7 | 2,38 |
| Опытная | 95,0 | 2005 | 41,5 | 2,23 |

В опыте, проведенном в ГППЗ "Большевик" на растущих курочках плимутрок с суточного до 7-недельного возраста, изучали действие целлюлобактерина на рост и выравнивание поголовья. Введение препарата в количестве 1 г на голову 1 раз в пять суток в течение 6 недель привело к увеличению живой массы курочек опытной группы на 7,7 % и лучшей выравниваемости поголовья (91,1 % в опытной и 73,3 % в контрольной группах).

Таким образом, использование целлюлобактерина при выращивании и откорме цыплят позволяет повысить эффективность производства — увеличить привесы, снизить отход молодняка, снизить затраты корма, повысить однородность поголовья.

Дальнейшие исследования, проведенные совместно с учеными ВНИТИП подтвердили целесообразность использования препарата в птицеводстве.

3.6. Использование целлюлобактерина в рыбоводстве.

В опытах с рыбой препарат вводили в кормовую смесь в количестве 1 и 2%, из которой методом сухого прессования на лабораторном грануляторе изготавливали гранулированные корма.

Скармливание целлюлобактерина в количестве 1% в гранулированных кормах, с содержанием 5,6 и 6,9% клетчатки способствовало увеличению конечной массы сеголеток карпа, соответственно, на 14 и 7%. Корм с содержанием 2% целлюлобактерина вызвал меньшую стимуляцию роста (5%) по сравнению с кормом того же состава, но без препарата.

О благоприятном действии целлюлобактерина свидетельствуют и более низкие затраты кормов на единицу прироста. Наибольший эффект роста был получен в период увеличения массы от 10 до 50 г. В этот период на кормах с 1% целлюлобактерина и содержанием клетчатки 5,9 % прирост молоди оказался выше на 26,5%, а с содержанием клетчатки 6,9% - на 12% по сравнению с контролем (без биопрепарата).

Положительные результаты от включения целлюлобактерина в корма были получены и при выращивании двухлеток карпа. Во всех вариантах при замене пшеницы на шроты и отруби и повышении при этом содержания клетчатки до 8,3-10,7% включение 1% целлюлобактерина вызывало повышение интенсивности роста, что отразилось на конечной индивидуальной навеске и на общей ихтиомассе рыб. Показатели крови и содержание жира в теле рыб колебались в пределах

нормы. Включение 2% целлюлозы в рацион либо не оказало улучшения результатов в сравнении с 1% биопрепарата, либо даже ухудшало их.

Аналогичные результаты были получены и на форели. Проведенные опыты показали также возможность производить замену более дорогой пшеницы на менее дефицитные растительные компоненты в составе кормов карпа и радужной форели, а также замену значительной части рыбной муки высокобелковым продуктом микробиологического синтеза гаприном в составе кормов форели.

3.7. Препарат целлюлозы-Т.

После изучения целлюлозолитической активности некоторых штаммов коллекции, а также их способности переносить нагревание, дальнейшую работу решено было продолжить с изолятом №1-85. На жидкой питательной среде №7 получили суточную культуру штамма №1-85. Её световое микроскопирование показало, что клетки подвижны и имеют форму палочек, различной длины. Измерение при помощи окуляра-микрометра позволило установить, что размеры вегетативных клеток лежат в пределах 1,8-2,0×5,0-9,0μ. При окраске по Граму клетки окрашивались положительно. При изучении 5-7 суточных культур отмечено образование спор эллиптической формы. Споры термостойкие, что подтверждается классической пастеризацией (прогреванием при 80°C в течение 10 минут).

По отношению к кислороду культура является факультативным анаэробом. Температурный оптимум роста 37°-38°C. Характерным признаком является рост на целлюлозном агаре Омелянского с добавлением рубцовой жидкости. На этой среде в течение 2-х, 3-х суток образуются поверхностные мелкие белые и глубокие чечевицеобразные колонии с зоной просветления (расщепления целлюлозы).

Установлено также, что изолят № 1-85 восстанавливает лакмусовое молоко, гидролизует крахмал, даёт положительную каталазную реакцию.

В соответствии с определителем бактерий Берги, по изученным морфологическим и культурально-биохимическим свойствам, штамм из коллекции группы зоотехнической микробиологии ГНУ ВНИИСХМ был отнесён ко второй группе рода *Bacillus*, («Определитель бактерий Берги», 1997). Дальнейшую идентификацию изолята проводили с использованием частотной матрицы для определения видовой принадлежности микроорганизмов р. *Bacillus* (Berkeley et al., 1984). С долей вероятности 97% штамм №1-85 был идентифицирован как *Bacillus pantothenicus*.

Как видно из рис.6., *B. pantothenicus* 1-85, при термической обработке (гранулирование и экспандирование, выдерживала высокие температуры. Как показали испытания, проведенные на птицах, препарат перенесший термическую обработку, обладал той же биологической эффективностью, как и не подвергавшийся обработке. Опыты, проведенные на птицах и крупном рогатом скоте подтвердили высокую эффективность препарата Целлюлозы-Т.

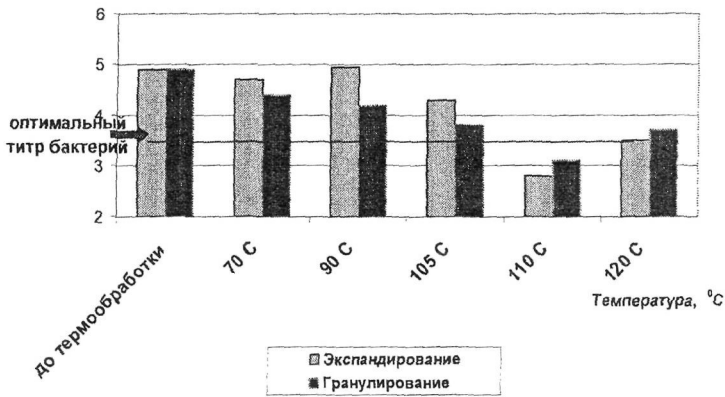


Рисунок 6. Влияние термообработки комбикормов на сохранность в них *Bacillus pantothenicus*

3.8. Препарат «Биотроф» для силосования зеленой массы трав.

Одной из проблем интродукции микроорганизмов в естественные системы является проблема конкурентоспособности интродуцированных бактерий, поскольку в этих условиях они сталкиваются с присутствующими местными штаммами бактерий. Если штамм-интродуцент превосходит резидентные штаммы по целевому признаку, то последние могут превосходить его по скорости роста и своей приспособленностью к условиям обитания. Создание специальных условий для более быстрого развития интродуцированного штамма не всегда возможно. Широкое использование технологии консервирования подвяленных трав целесообразно в связи с уменьшением потерь при силосовании, а также с возможностью создания повышенного осмотического давления в силосуемой массе.

Такое повышенное осмотическое давление создает селективное преимущество для осмоотолерантных штаммов, интродуцированных массу подвяленных трав. У производственного штамма *Lactobacillus plantarum* 52 был получен осмоотолерантный спонтанный мутант, обозначенный нами как *Lb 60*. У этого мутанта был также получен спонтанный мутант, устойчивый к антибиотику рифампицину (с целью быстрого его обнаружения его в силосе). Как следует из рис. 7 в подвяленной массе действительно содержание клеток осмоотолерантного штамма *Lb 60 rif* выше, чем в неподвяленной массе.

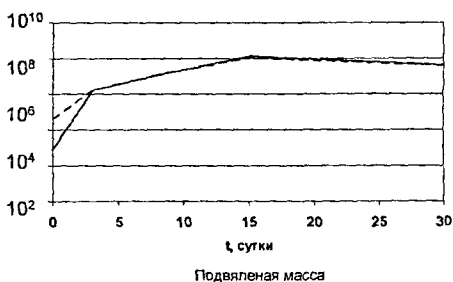
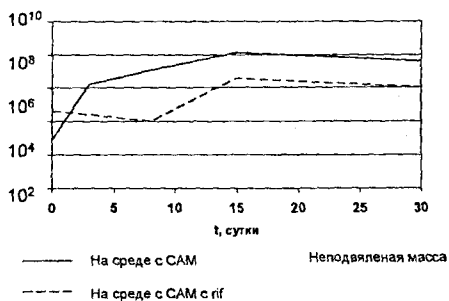


Рисунок 7. Численность молочнокислых бактерий в силосуемой массе

Проверка эффективности силосования провяленных трав с добавкой препарата, полученного на осмоотолерантном штамме *L. plantarum 60* (далее препарат Биотроф) была проведена в производственных условиях ЭСХ «Дятьково» Брянской области (Опытное хозяйство ВНИИ кормов им.В.Р.Вильямса РАСХН) сотрудниками этого института Ю.А.Победновым и В.В.Худокормовым. В качестве сырья для силосования использовали злаково-клеверную смесь второго укоса (30 дней роста), провяленную в течение 1-2 суток до содержания сухого вещества 35-40%. В одну траншею был заложен обычный силос, в другую – с добавкой препарата «Биотроф». Спустя 4 месяца была проведена органолептическая оценка полученного корма и определено его качество по продуктам брожения. Тот и другой силос имели хорошие органолептические показатели и высокое качество (низкое содержание аммиака и хорошее соотношение продуктов брожения (табл. 10).

Таблица 10

| Силос | Содержание сухого вещества, % | РН | Содержание в сухом веществе, % | | | |
|-------------|-------------------------------|-----------|--------------------------------|---------------------|-----------|-----------|
| | | | аммиака | органических кислот | | |
| | | | | молочной | уксусной | масляной |
| Без добавок | 33,1±4,24 | 4,62±0,12 | 0,27±0,05 | 9,75±0,71 | 2,84±1,43 | 0,05±0,08 |
| С Биотроф | 38,67±3,24 | 4,41±0,16 | 0,16±0,02 | 11,98±2,32 | 1,65±0,22 | 0,00±0,00 |

Следует отметить, что опытный силос характеризовался более высокой активной кислотностью, несмотря на несколько более высокое содержание в нем сухого вещества. В результате более быстрого подкисления в нем быстрее снизилась жизнедеятельность нежелательной микрофлоры, о чем свидетельствовало резкое (в 1,7 раза) сокращение образования аммиака и уксусной кислоты, при полном отсутствии масляной кислоты (Табл.10).

Для выявления кормового достоинства оба полученных корма скармливали в научно-хозяйственных опытах лактирующим коровам, телкам и откормочным бычкам черно-пестрой породы. В учетный период (93-94 дня) рацион всех животных состоял из силоса (контрольного или опытного), который в опытах на телках скармливался с добавкой зерновых концентратов (2,7 кг/животное в сутки), а в опытах на коровах и бычках – с добавкой зерновых и белковых концентратов (соответственно 5,9-6,0 и 2,1 кг/животное в сутки и 1,2 и 1,0 кг/животное в сутки). Дополнительно рацион балансировался минеральными добавками.

Результаты опыта показали, что поедаемость коровами сухого вещества опытного рациона возросла на 0,5 кг. Это обусловлено лучшим потреблением силоса, приготовленного с добавкой препарата Биотроф. В таблице 11 приведена молочная продуктивность и изменение живой массы коров в учетный период.

Среднесуточный удой у коров, потреблявших в рационе опытный силос, был на 1,5 кг или 8,1% выше, чем у животных контрольной группы.

Таблица 11

Молочная продуктивность и изменение живой массы коров в учетный период

| Показатели | Группы коров | |
|---------------------------------------|--------------|-------------|
| | Контрольная | опытная |
| Среднесуточный удой молока, кг | 18,5±1,54 | 20,0±3,20 |
| Жирность молока, % | 3,97±0,46 | 3,97±0,36 |
| Среднесуточный удой 4% молока | 18,4±2,46 | 19,8±3,32 |
| Среднесуточный прирост живой массы, г | 291,0±214,0 | 133,0±210,4 |

Переваримость сухого вещества рационов контрольной и опытной группы была практически одинаковой и составила, соответственно, 67,03 и 67,73%. Отмечена высокая переваримость протеина опытного рациона в сравнении с контрольным 69,2 и 61,7%. Хотя концентрация обменной энергии в сухом веществе возросла незначительно (с 10,14 до 10,29 МДж), эффективность использования ее возросла на с 57,4 МДж до 60,1 МДж. Это сказалось на величине затрат на питательных веществ, используемых на синтез 1 л молока. Как следует из табл. 12, включение в рацион коров силоса, с добавкой препарата Биотроф, привело к

заметному сокращению расхода сухого вещества, обменной энергии, сырого протеина и зерновых концентратов в расчете на 1 л молока.

Таблица 12

Затраты питательных веществ и отдельных кормов на синтез 1 кг молока

| Показатели | Группы коров | |
|-------------------------|--------------|---------|
| | Контрольная | опытная |
| Сухого вещества, кг | 0,86 | 0,82 |
| Обменной энергии, МДж | 8,7 | 8,4 |
| Сырого протеина, г | 122,0 | 116,0 |
| Ячменной дерги, кг | 0,32 | 0,30 |
| Подсолнечного жмыха, кг | 0,11 | 0,11 |

Значительное увеличение продуктивного действия силоса с добавкой препарата Биотроф получено и в опытах на молодняке крупного рогатого скота. Из данных табл. 13 видно, что включение в рацион телок такого силоса при выращивании и бычков при откорме, способствовало заметному увеличению их среднесуточного прироста в течение 93 дней опыта.

Экономическая оценка эффективности силосования провяленной злаково-клеверной смеси с добавкой препарата Биотроф показала (табл.14.), что все дополнительные затраты, связанные с внесением указанного препарата полностью окупаются за счет повышения сохранности корма и его энергетической питательности. Исходя из того, что затраты связанные с расходом концентратов и содержанием животных, в той и другой группе были одинаковыми, дополнительная прибыль от использования препарата Биотроф при силосовании целиком определялась стоимостью дополнительно полученного молока и составила 84,6 тыс. руб в расчете на 100 га площади посевов трав. В пересчете на 1

л препарата (15 т силоса) экономическая эффективность составила 2300 р. По этим же данным экономическая эффективность 1 л препарата при заготовке силоса для бычков на откорме составила 3700 р.

Таблица 13

Изменение живой массы и среднесуточного прироста молодняки крупного рогатого скота

| Показатели | Пол и группы животных | | | |
|--|-----------------------|--------------|--------------|--------------|
| | Телки | | бычки | |
| | Контрольная | опытная | контрольная | опытная |
| Живая масса в начале учетного периода, кг | 322,3±25,00 | 308,3±26,10 | 205,0±15,14 | 204,0±17,67 |
| Живая масса в конце учетного периода, кг | 405,0±24,70 | 400,0±26,30 | 279,0±14,55 | 296,0±18,24 |
| Среднесуточный прирост живой массы, г/животное и % | 884,0±95,70 | 986,0±120,10 | 793,0±145,12 | 979,0±123,37 |
| | 100,0 | 111,1 | 100,0 | 123,4 |

Таблица 14

Экономическая эффективность силосования злаково-клеверной смеси с добавкой препарата Биотроф (в расчете на 100 га площади посевов).

| Показатели | Варианты силосования | |
|---|----------------------|--------------------|
| | Без добавок | + препарат Биотроф |
| Заготовлено силосуемой массы, т | 552,0 | 552,0 |
| Заготовлено сухого вещества, т | 219,4 | 219,4 |
| Сохранность сухого вещества, % | 90,1 | 96,2 |
| Выход сухого вещества, т | 197,7 | 211,1 |
| Выход обменной энергии, ГДж | 1818,8 | 2047,7 |
| Прямые затраты на заготовку силоса, руб | 55043,0 | 59850,0 |
| Затраты на заготовку 1 т сухого вещества, руб | 278,4 | 283,5 |
| Затраты на 1 МДж обменной энергии, коп | 3,42 | 3,40 |
| Произведено молока, т | 430,3 | 444,4 |
| Стоимость молока (6 руб/кг) тыс. руб | 2581,8 | 2666,4 |
| Дополнительная прибыль, тыс. руб | - | 84,6 |

В отличие от химических консервантов, силосные закваски являются полностью безопасными для персонала, проводящего силосование, поскольку не содержат токсичных и пахнущих компонентов. Они не являются химически агрессивными и не приводят к коррозии аппаратуры, используемой для их внесения в силос. Полученный силос является экологически чистым, он не содержит консервантов и продуктов их распада. Силос, полученный с биологической закваской Биотроф, не уступает по качеству силосу, приготовленному с химическим консервантом, при этом затраты на закваску Биотроф в 10-15 раз ниже, чем на химический консервант.

3.9. Препарат для консервирования плющеного зерна «Биотроф-600»

Консервирование плющеного зерна ранних стадий спелости является исключительно перспективным направлением в кормопроизводстве. Высокие производственные показатели молочных хозяйств Ленинградской области во многом обусловлены применением данной технологии.

Более широкое применение технологии в какой-то степени сдерживается высокой стоимостью химических консервантов. Муравьиная кислота, составляющая основу консерванта небезопасна для человека. В реальной жизни сельскохозяйственного предприятия заготовку зачастую проводят в замкнутых помещениях. В этих условиях пары муравьиной кислоты могут приводить к отравлениям персонала.

Известно, что микробиологические процессы при консервировании силоса принципиально отличаются от таковых, при консервировании зерна. Трава, как правило, содержит достаточно много сахаров. На траве содержится много спонтанных молочнокислых бактерий. Они быстро размножаются в силосе и синтезируют молочную кислоту. Именно поэтому хозяйства иногда получают качественный силос, не применяя ни заквасок, ни химических консервантов. Зерно, однако, не содержит достаточного количества сахаров.

Изучение микрофлоры зерна показало, что при отсутствии консервантов в зерне очень быстро развиваются плесневые грибы родов *Aspergillus* и *Penicillium*. В связи с этим был проведен скрининг изолятов, способных подавлять рост грибов. Наиболее активный изолят (№600) был определен нами как *Lactobacillus buchneri*.

Клетки имеют форму коротких палочек, одиночные или в цепочках. Грамположительные, каталазоотрицательные. Колонии на МПА с глюкозой – мелкие, точечные, глубинные. Желатину не разжижают, казеин не расщепляют. Обладают слабой амилазной активностью. Штамм обладает антагонистической активностью к грибам рода *Penicillium*, *Aspergillus niger* и *A. flavus*, дрожжам родов *Torula*, *Pichia* и *Saccharomyces*.

Образуют газ из глюкозы и глюконата. Оптимум роста – 25-37°C. Растут при 15°C, не растут при 45°C. Растут в присутствии 6% NaCl. Сбраживают сахара: арабинозу, фруктозу, глюкозу, мальтозу, рибозу, ксилозу, слабо сбраживают раффинозу. Не сбраживают: целлобиозу, рамнозу, сорбит, маннит, галактозу, мальтозу, сахарозу, лактозу.

Для выявления способности штамма *L. buchneri* 600 оказывать ингибирующее влияние на развитие плесневых и фитопатогенных грибов была протестирована его антифунгальная активность против *F. graminearum*, *F. oxysporum* и *F. solani*. Живая культура лактобацилл подавляла рост мицелия, и зоны ингибирования составляли в среднем 15 мм, в зависимости от вида гриба. Анализ антифунгальной активности неразделенного на фракции этилацетатного экстракта культуральной жидкости бактерий, выращенных на картофельной среде, показал наличие высокой антифунгальной активности – зона ингибирования роста мицелия *F. graminearum* составляла 50 ± 10 мм.

Хроматографический анализ полученного экстракта культуральной жидкости обнаружил наличие группы интенсивных пиков с временем удержания 3 – 26 мин (рис.8).

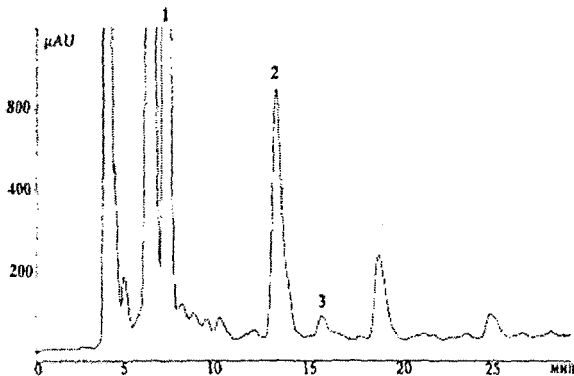


Рис. 8. HPLC анализ этилацетатного экстракта культуральной жидкости штамма *Lactobacillus buchneri* 600. 1 – масляная кислота; 2 – неидентифицированный антифунгальный метаболит; 3 – валериановая кислота.

Анализ антифунгальной активности соединений, соответствующих пикам, зарегистрированным в пробе, показал наличие ингибирующего влияния на рост мицелия *F. graminearum* соединения 1 (зона 56 ± 8 мм) и 2 (зона 10 ± 2 мм), активность соединения 3 была незначительна. Эффект метаболита 3 был скорее фунгистатическим (наблюдалась задержка прорастания спор), тогда как фракции 1 и 2 полностью подавляли развитие гриба. Сравнение времен удержания веществ в стандартной смеси предельных карбоновых кислот жирного ряда и пиков в анализируемом экстракте показало, что соединение 1 соответствует масляной, а соединение 3 – валериановой кислотам (рис. 8). Концентрация масляной кислоты в культуральной жидкости достигала 1360 ± 200 нМ, а концентрация валериановой кислоты – 61.7 ± 9.8 нМ. Метаболит, соответствующий фракции 2 не был идентифицирован.

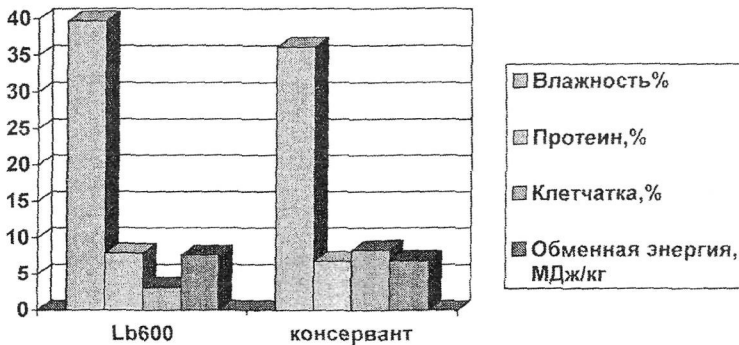


Рис.9. Результаты производственных испытаний препарата Биотроф-600 в АОЗТ «Родина» Сланцевского района Ленинградской области.

Производственные опыты по испытанию нового препарата «Биотроф-600» были проведены в АОЗТ «Родина» Ленинградской области, в которых были заложены партии зерна с препаратом и с химическим консервантом. Результаты анализа зерна приведены на рис. 9. Результаты широких производственных испытаний убедили в целесообразности использования препаратов на основе *L. buchneri* для консервирования влажного плющеного зерна. Все опытные партии заготовленные с биопрепаратом, были не хуже, заготовленных с химическими консервантами, как по содержанию сырого протеина, так и по обменной энергии.

Производственные испытания препарата проводились не только в Ленинградской области, но и в Московской, Белгородской областях, Татарстане и Белоруссии.

3.10. Препарат Биотроф-111

Для гарантированного повышения качества силоса и его сохранности крайне желательно, чтобы интродуцируемый в силосуюемую массу штамм бактерий обладал как бактерицидными, так и фунгицидными свойствами. Исходя из данных

литературы, этими свойствами обладают бактерии рода *Bacillus*. Из нескольких изолятов был отобран штамм *B. subtilis 111*, у которого способность подавлять дрожжи, плесневые грибы и бактерии кишечной группы была выше, чем у других изолятов. Размер зон подавления тест-штаммов приведен в табл.15.

Таблица 15
Антагонистическая активность штамма *Bacillus subtilis- 111* по отношению к различным микроорганизмам.

| Тестовые микроорганизмы | Зона подавления роста тестовых м/о в присутствии штамма №111 в мм |
|----------------------------|---|
| 1. <i>Torula</i> | 5 |
| 2. <i>Pichia</i> | 10 |
| 3. <i>Sacharomyces</i> | 7 |
| 4. <i>Penicillium</i> | 35 |
| 5. <i>Aspergillus</i> | 24 |
| 6. <i>Fusarium</i> | 37 |
| 7. <i>Escherichia coli</i> | 15 |

Результаты полученные совместно с сотрудниками ВНИИ кормов Ю.А.Побединовым, А.А.Мамаевым и Н.Н.Щукиным, показали, что использование штамма с высокой антагонистической активности как против бактерий, так и против плесневых грибов и дрожжей, в качестве инокулянта для силоса привело к получению качественного корма, при этом потери сухого вещества были невелики (табл.16)

Таблица 16.

Эффективность консервирования несиловующихся трав препаратами Биотроф 111 и АИВ-3 плюс

| Варианты консервирования | Объем газов, л/кг | рН | Содержание в сухом веществе корма, % | | | |
|---|-------------------|------|--------------------------------------|---|--------|------|
| | | | аммиака | Органических кислот молочной масляной | Сахара | |
| Козлятник восточный (20,6% СВ, сахаро-буферное отношение 0,6) | | | | | | |
| Без добавок | 55,8 | 5,92 | 1,57 | 11,85 | 3,79 | 0,14 |
| С Биотроф 111 | 23,8 | 6,06 | 0,94 | 8,86 | 2,65 | 0,17 |
| С АИВ-3 плюс | 1,2 | 4,20 | 0,29 | 8,54 | 0,00 | 1,18 |
| Люцерно-злаковая смесь | | | | | | |
| Без добавок | 17,3 | 4,65 | 1,10 | 14,98 | 0,98 | 0,20 |
| С Биотроф 111 | 16,8 | 4,60 | 0,58 | 14,84 | 0,41 | 0,15 |
| С АИВ-3 плюс | 12,4 | 4,08 | 0,56 | 14,32 | 0,00 | 0,95 |

Производственные испытания показали, что привесы бычков, получавших силос, приготовленный с использованием *B. subtilis 111*, статистически не отличались от силоса, приготовленного с таким качественным химическим консервантом, как АИВ-3 плюс (табл.17). Более того, препарат Биотроф-111 более надежно устранял маслянокислосое брожение.

Таблица 17.

Живая масса и среднесуточный прирост животных в учетный период опыта

| Показатели | Варианты опыта | |
|--|----------------|------------|
| | Биотроф 111 | АИВ-3 плюс |
| Живая масса бычков, кг | | |
| В начале учетного периода | 246,1±3,02 | 251,1±4,87 |
| В конце учетного периода | 308,9±4,13 | 313,1±5,56 |
| Среднесуточный прирост живой массы, г/животное | 1031,0±41,9 | 1018±46,3 |

4. Выводы

1. Исследованиями установлено, что в рубце клинически здоровых животных неполное переваривание клетчатки не связано с дефицитом целлюлаз. Интродукция целлюлозолитических микроорганизмов целесообразна в случае дисбаланса микрофлоры при смене рационов или нарушениях нормальной физиологии рубца.

2. Изучение свойства целлюлаз *R. albus* и *Bacillus pantothenicus* показало, что целлюлазные комплексы этих бактерий расположены на поверхности бактериальных клеток, как это имеет место у целлюлосомоподобных структур.

3. Разработан ферментативный препарат-пробиотик целлобактерин. У телят целлобактерин способствует ускоренному развитию рубцовой микрофлоры и нормализует работу пищеварительной системы. Наибольший эффект достигается при скармливании препарата телятам в возрасте от 2-х до 4-х месяцев. Применение в более раннем возрасте также возможно и целесообразно.

4. Использование целлобактерина в рационах телят повышает их жизнеспособность и аппетит, повышает среднесуточные привесы в сравнении с контролем на 10-20%. Целлобактерин способствует поддержанию нормальной микрофлоры рубца у коров, что обеспечивает увеличение продуктивности и улучшение качественных характеристик молока.

4. Скармливание целлобактерина в рационах бройлеров увеличивает среднесуточные привесы на 3-10% и снижает затраты корма на единицу привеса на 9-15% у бройлеров, у яичных молодых улучшает выравненность стада к началу продуктивного периода, что обеспечивает повышение яйценоскости на 8-12% и уменьшение затрат корма на продукцию на 5-7%. Включение целлобактерина удешевляет рацион для несушек за счет более широкого использования подсолнечного шрота (до 20-30%) и отрубей, а также повысить устойчивость птицы к стрессам.

5. Поросятам рекомендуется давать целлобактерин с первых дней жизни. В подсосный период целлобактерин ускоряет рост и повышает сохранность. После отъема целлобактерин компенсирует недостаток собственных пищеварительных ферментов у поросят, облегчая переход к концентратному кормлению.

Увеличение привесов поросят до постановки на откорм благодаря действию препарата может составлять до 30%. В период откорма свиней целлобактерин позволяет существенно снизить стоимость рационов за счет большего включения шротов и отрубей, уменьшить затраты корма на привес и повысить сохранность.

6. Разработан препарат целлобактерин-Г, который отличается от целлобактерина и других ферментативных и пробиотических препаратов уникальной

термостабильностью. Целлобактерин-Т выдерживает не только обычное гранулирование, но также экспандирование и экструдирование при температуре до 105°C.

7. На основе осмоотолерантного штамма (*L. plantarum* 60) разработан препарат для консервирования подвяленных трав. Приготовленный силос с закваской Биотроф лучше поедается животными и оказывает положительное влияние на их продуктивность. При скармливании силоса, приготовленного с закваской Биотроф лактирующим коровам, удой молока повышаются на 5-7%, процент жира в молоке - на 0,1%, снижается кислотность молока (на 1%).

8. На основе гетероферментативной бактерии *Lactobacillus buchneri* 600 разработан безопасный препарат для консервирования плющеного зерна Биотроф-600.

9. На основе *B. subtilis* 111 разработан препарат для консервирования корма с высокой влажностью (Биотроф-111). Экспериментально доказана возможность эффективного использования препарата при силосовании несилосующихся трав (с сахаро-буферным отношением менее 1,0), но при условии их обязательного провяливания до содержания сухого вещества не менее 35%.

Предложения производству

1. Рекомендуем использовать препарат целлобактерина в кормах:

- телятам в возрасте 2-4 мес. в дозах: 2 г/гол. ежедневно, или 10 г/гол один раз в 5 суток;

- для коров дозировка: 10-25 г/гол ежедневно или 50-125 г/гол один раз в 5 суток.

Коровам дойного стада следует скармливать целлобактерин, в первую очередь, в стойловый период. Особенно важно применять препарат при переходах от пастбищного к стойловому содержанию и обратно;

- поросётам-сосунам рекомендуем дозу целлобактерина – 1 г/гол/сутки, для других возрастных групп – 1 кг на тонну комбикорма;

- при выращивании цыплят следует в основной рацион вводить целлобактерин в дозе 1 г на голову 1 раз в пять суток;

- вводить целлобактерин для рыбы в количестве 1% на тонну комбикорма.

2. При силосовании вносить в зеленую массу трав препарат Биотроф и Биотроф-111 в количестве 1 л на 15г зеленой массы, препарат Биотроф-600 – 0,5 л на 1 т плющеного зерна.

Лаптевым Г.Ю. по теме диссертации опубликовано 65 научных работ, основными из которых являются:

В рецензируемых журналах и изданиях, определенных ВАК РФ:

1. Эрнст Л.К., Дебабов В.Г., Лившиц В.А., Лаптев Г.Ю. Жизнеспособность *Escherichia coli* K-12 в кишечнике свиней// Доклады ВАСХНИЛ. – 1984. - №8. - С. 21-22.
2. Эрнст Л.К., Лаптев Г.Ю., Дебабов В.Г., Лившиц В.А. Влияние антибиотиков на выживаемость штамма *E. coli* K12, продуцирующего тресонин, в кишечнике цыплят// Вестник сельскохозяйственной науки. 1986. - №11. – С. 108-110.
3. Эрнст Л.К., Лаптев Г.Ю., Бараболя М.А. Анаэробные грибы в рубце крупного рогатого скота// Вестник сельскохозяйственной науки. – 1990. - № 3. - С. 43-45.
4. Лаптев Г.Ю. Анаэробные грибы-хитридиомицеты в рубце жвачных животных // Микология и фитопатология. – 1990. - Т. 24. - Вып. 4. - С. 372.

5. Лаптев Г.Ю., Эрнст Л.К., Солдатова В.В. Интродукция целлюлозолитической бактерии в рубец крупного рогатого скота для повышения переваримости клетчатки//Сельскохозяйственная биология – 1994. - № 4. - С. 34-39.

6. Эрнст Л.К., Остроумова И.Н., Тимошина Л.А. Мосейчук К.Б., Лаптев Г.Ю., Солдатова В.В., Бараболя М.А., Прокопьева В.И., Смирнова Л.В. Рост и физиологические показатели карпа и 2. радужной форели под влиянием микробного биопрепарата целлобактрина// Сельскохозяйственная биология. – 1995. - № 6. - С.94-103.

7. Лаптев Г.Ю. Взаимоотношения между популяциями целлюлолитических микроорганизмов при переваривании клетчатки содержимым рубца жвачных// Прикладная биохимия и микробиология. - 1995. - Т. 31. - № 4. - С. 441-446.

8. Лаптев Г., Солдатова В., Саисц В. Сравнение способов консервирования корма// Молочное и мясное скотоводство. – 2004. - №2. - С.18-19.

9. С.М. Кислюк, Н.И. Новикова, Г.Ю. Лаптев Целлобактерин-многофункциональная кормовая добавка//Свиноводство. – 2004. - №3. - С. 34.

10. Лаптев Г., Новикова Н., Кислюк С., Имангулов Ш., Игнатова Г., Первова А. Ферментативный пробиотик: два в одном//Птицеводство. – 2004. - №7. - С. 10-11).

11. Имангулов Ш., Игнатова Г., Кислюк С., Лаптев Г., Новикова Н. Удвоенная норма пивной дробины в рационе кур//Птицеводство. – 2005. - №8. С. 7-8.

12. Лаптев Г., Полуляшина С., Некрасов Р., Киринос И. Фактор повышения молочной продуктивности коров в период раздоя//Зоотехния. – 2008. - №10. - С. 20-21.

13. Лаптев Г., Бедный С. Ферментативный пробиотик целлобактерин в комбикормах для свиней на откорме//Свиноводство. – 2008. - № 5. - С. 17-19.

Патенты

14. Лаптев, Г.Ю., Патент на изобретение № 2168909, 2001. Штамм бактерий *Lactobacillus plantarum* для силосования кормов// Грудинина Т.Н., Лаптев Г.Ю., Прокопьева Е.И., Солдатова В.В./

15. Лаптев, Г.Ю. Патент на изобретение № 2171037, 2001. Способ кормления цыплят и способ получения препарата для цыплят/ Грудинина Т.Н., Лаптев Г.Ю., Прокопьева Е.И., Солдатова В.В./

16. Лаптев, Г.Ю. Патент на изобретение № 2235772, 2004. Штамм бактерий *Bacillus pantothenicus* 1-85 для использования в гранулированных кормах/ Грудинина Т.Н., Лаптев Г.Ю., Прокопьева Е.И., Солдатова В.В., Проворов Е.Л./

17. Лаптев, Г.Ю., Патент на изобретение № 2243999, 2005. Штамм бактерий *Lactobacillus buchneri* для силосования зеленой массы кукурузы и консервирования плющеного зерна/ Грудинина Т.Н., Лаптев Г.Ю., Прокопьева Е.И., Солдатова В.В./

В монографиях и концепциях

18. Азманов Н.Р., Алексеев Ю.В., Алексеева Н.И., Лаптев Г.Ю. и др. Региональная целевая комплексная программа интенсификации кормопроизводства «Корма» Ленинградской области на 2000-2005 гг./ Санкт-Петербург. – СЗНИИМЭСХ. - 2000. – 133 с.

19. Эрнст Л.К., Лаптев Г.Ю., Использование рекомбинантных и нерекомбинантных микроорганизмов для оптимизации микрофлоры желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственных животных/ Москва. - 2002. - 67 с.

20. Тихонович И.А., Кожемяков А.П., Чеботарь В.К., Круглов Ю.В., Кандыбин Н.В., Лаптев Г.Ю./ Биопрепараты в сельском хозяйстве. - Москва. - 2005. – 154 с.

В сборниках научных трудов и периодической печати

21. Эрнст Л.К., Лаптев Г.Ю. Разработка методов управления экосистемой желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственных животных, В сб. Биоценоз в природе и промышленных условиях. АН СССР, Научный центр биологических исследований, Пушкино. – 1987.
22. Эрнст Л.К., Лаптев Г.Ю. Роль анаэробных грибов рубца в переваривании клетчатки. Бюллетень ВНИИ физиологии, биохимии и питания с.-х. животных. – 1991. - №1, С. 21-25.
23. Эрнст Л.К., Лаптев Г.Ю., Солдатова В.В., Калдмяз Х., Вади М. Новый комплексный препарат-пробиотик для стимуляции процессов пищеварения. В сб. Биологические основы высокой продуктивности сельскохозяйственных животных. – 1991. – Боровск. – ВНИИФБиП. - С. 137-141.
24. Калдмяз Х., Вади М., Солдатова В.В., Лаптев Г.Ю. Новый биопрепарат в рационах телят. // Сб. трудов Эстонского института животноводства и ветеринарии. – Таллинн. – 1992. - Т. 63. - С. 57-65.
25. Киселева Н., Лаптев Г., Солдатова В. Использование целлюлобактерина в птицеводстве // Комбикорма. – 2000. - №5. - С. 39.
26. Киселева Н., Лаптев Г., Мудрова Ю. Подсолнечниковый шрот в кормлении бройлеров // Животноводство России. – 2001. - №9. - С. 43.
27. Богомолов В.В. Лаптев Г.Ю. Новая закваска для силосования кормов // РацВетИнформ. – 2002. - №5. - С. 27.
28. Лаптев Г.Ю., Солдатова В.В., Брянцев С.С., Веселов А.В. Методические рекомендации по применению силосной закваски/ Санкт-Петербург. – 2001.
29. Лаптев Г.Ю., Цой Л.А. Новая закваска для силосования кормов/ Сельскохозяйственные вести. – 2001. - №2. - С. 12.
30. Лаптев Г., Солдатова В., Баранихин А., Винокурова Т. Целлюбактерин® — пробиотик, повышающий удои // Животноводство России. – 2003. - №10. – С.18, 19.
31. Лаптев Г., Солдатова В., Варакина С., Новикова Н. Качественный силос – с закваской Биотроф // Животноводство России. – 2002. - №4. - С. 40.
32. Лаптев Г.Ю. Консервирование кормов с использованием биологической закваски. В кн.: Современные проблемы увеличения производства кормов и повышения их питательной ценности в условиях Северо-Западного региона РФ // Санкт-Петербург – Петрозаводск. - 2002. - С. 51-53.
33. Лаптев Г.Ю., Солдатова В.В., Трокова Е.Ю. Биотроф повышает качество зерносажа // Животноводство России. – 2006. - № 4. - С. 37.
34. Эрнст Л.К., Лаптев Г.Ю. Ферменты улучшают переваривание клетчатки // Животноводство России. – 2006. - № 10. – С.36-37.
35. Лаптев Г.Ю. Лактатный ацидоз? Причина - в рационе // Животноводство России. – 2007. - №4. - С. 41-42.
36. Лаптев Г.Ю. Биотроф-111 повышает качество силоса из бобовых трав // Животноводство России. – 2007. - № 9. – С. 41.
37. Лаптев Г.Ю. Проблемы консервирования влажного силоса // Животноводство России. – 2007. - № 9. - С.65.
38. Лаптев Г.Ю. Качество силоса и ферменты // Животноводство России. – 2008. - №4. - С. 64-65.
39. Никонов И., Большаков В., Лаптев Г. Консервирование пивной дробины // Животноводство России. – 2008. - № 2. - С.67.

40. Лаптев Г.Ю. Проблемы консервирования влажного силоса//Животноводство России. – 2009, - № 3. - С. 27.

41. Романов В., Полуляшина С., Лаптев Г. Целлобактерин повышает молочную продуктивность стада // Животноводство России. Спецвыпуск. – 2008. – С.2-3.

42. Лаптев Г.Ю., Кислюк С.М. Подбор кормовых добавок для конкретного рациона в настоящем и будущем / В сб. Достижения в современном птицеводстве. Исследования и инновации. ВНАП. Российское отделение, Сергиев Посад. 2009.

Подписано к печати 3.11.09 г.
Формат 60x90^{1/16}. П. л. 2. Тираж 150 Заказ 230

Отпечатано в типографии
Санкт-Петербургского государственного аграрного университета
г. Пушкин, ул. Садовая д. 14