

И.А. Найденко, В.В. Денисенко, М.Е. Сафонова

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Введение. Молочнокислые бактерии – группа грамположительных факультативно анаэробных микроорганизмов, объединяющая представителей родов *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Paralactobacillus*, *Amylolactobacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Agrilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Fructilactobacillus*, *Acetilactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Secundilactobacillus* и др. по способности сбраживать углеводные субстраты с образованием молочной кислоты в качестве основного продукта.

Эти микроорганизмы традиционно широко используются в разных отраслях: в хлебопечении, консервировании овощей и фруктов, получении разнообразных кисломолочных продуктов, при засоле рыбы, изготовлении некоторых мясных продуктов, получении молочной кислоты, для синтеза декстрана, как основа препаратов пробиотического действия и др.

Важной областью применения молочнокислых бактерий является кормопроизводство – получение силосованных кормов. Силосование представляет собой сложный биологический процесс, основанный на деятельности микроорганизмов. При этом в силосуемой массе без доступа воздуха в результате микробиологических и биохимических процессов накапливаются органические кислоты, в основном молочная и уксусная. Максимальное стимулирование в силосуемой массе молочнокислого брожения, позволяющего наиболее эффективно трансформировать углеводы в молочную кислоту, способствует минимизации потерь питательных веществ в корме. В то же время в составе естественной эпифитной микрофлоры исходной растительной массы содержание молочнокислых бактерий часто недостаточно для обеспечения быстрой ферментации и получения качественного силоса.

Для сокращения потерь в процессе силосования и повышения качества корма используют многие приемы, в том числе внесение в зеленую массу разных добавок – ферментируемых углеводов, биологических препаратов, химических консервантов, ферментных препаратов и др. Использование бактериальных заквасок является экологически безопасным и одним из наиболее эффективных способов, обеспечивающих заготовку качественного корма.

Молочнокислые бактерии являются основным компонентом большинства силосных заквасок. Внесение в силосуемую массу препаратов на основе специально отобранных культур молочнокислых бактерий позволяет интенсифицировать процесс молочнокислого брожения, быстро снизить pH, подавить развитие нежелательных микроорганизмов, жизнедеятельность которых связана с расходом белков, накоплением масляной кислоты и токсичных аминов. В результате регулирующего действия заквасочной микрофлоры сокращаются потери белковых и других питательных веществ в процессе силосования, корм обогащается биологически активными соединениями, в нем оптимизируется соотношение органических кислот, улучшаются органолептические качества.

В связи с этим актуальным является выделение из природных источников и отбор новых активных штаммов молочнокислых бактерий, перспективных для включения в состав препаратов предназначенных для повышения качества силосованных кормов.

Объекты и методы исследования. Объектами исследований служили выделенные из растительных источников штаммы молочнокислых бактерий, а также исходная зеленая масса и разные варианты силосуемых кормов.

Выделение, первичную идентификацию и изучение морфолого-культуральных и физиолого-биохимических свойств молочнокислых бактерий проводили общепринятыми методами [1,2].

Культивирование бактерий (глубинное или поверхностное, в жидких или на агаризованных средах, в аэробных или микроаэробных условиях) осуществляли в термостате при 25-37⁰С. В качестве посевного материала использовали 18-часовые физиологически активные (инокулят III генерации) культуры бактерий, 0,5 – 1,0 об. % которых вносили в питательную среду. Молочнокислые бактерии поддерживали на слабо агаризованной среде MRS [3].

Морфологию бактерий изучали на препаратах живых и фиксированных окрашенных клеток с использованием световой и фазово-контрастной микроскопии. Окраску по Граму проводили в модификации Хукера [1]. Основные физиолого-биохимические характеристики исследуемых культур определяли с использованием общепринятых методов [1–4].

Активность кислотообразования определяли титрометрическим и потенциометрическим методами. pH измеряли потенциометрически с помощью мембранного pH-метра HI-8314 (Hanna instruments, Португалия). Титруемую кислотность культуральной жидкости определяли титрометрическим методом. Результаты выражали в градусах Тернера ($^{\circ}\text{T}$).

Результаты и обсуждение. Из разных растительных источников и вариантов силосованных кормов методами накопительной культуры и прямого высева образцов нами было выделено более 200 изолятов.

Полученные чистые культуры характеризовались бродильным типом метаболизма глюкозы с образованием кислых продуктов, отсутствием цитохромсодержащих дыхательных систем, отрицательной реакцией на каталазу и в большинстве случаев – на нитратредуктазу, аэротолерантностью, требовательностью к ростовым факторам. Совокупность перечисленных свойств, а также характерные морфолого-культуральные признаки (аспорогенные неподвижные грамположительные палочковидные и кокковидные клетки, равномерный рост по уколу в агаризованной среде, слабый поверхностный рост или его полное отсутствие, типичные глубинные колонии) позволили отнести выделенные бактерии к группе молочнокислых.

Важным признаком штаммов – потенциальных компонентов бактериальных препаратов для силосования растительного сырья – является высокая активность кислотообразования.

Выделенные микроорганизмы различались по активности роста и кислотообразования. Среди изучаемых культур были сильные и слабые кислотообразователи (таблица).

Слабые кислотообразователи, подкисляющие культуральную жидкость не более чем до 45°T , выделялись преимущественно из вегетирующих растений; единичные штаммы – из измельченной растительной массы и на 14-е, 93-и, 133-и сутки силосования.

Источником выделения штаммов молочнокислых бактерий с уровнем ацидогенеза выше 50°T служили преимущественно силосуемые корма разных вариантов.

Культуры, подкисляющие среду более 200°T , в среднем выделялись на 34-41 день позже, чем штаммы с активностью кислотообразования в пределах $51-200^{\circ}\text{T}$ (таблица).

Большинство выделенных штаммов образовывали типичные чечевице- и лодочкообразные колонии, расположенные в толще среды.

Предварительная идентификация выделенных микроорганизмов с использованием разработанных нами дифференцирующих схем позволила выявить таксономическое разнообразие молочнокислых бактерий, выделяемых из микробного ценоза силосуемых растений: представители родов *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactiplantibacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Latilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Lentilactobacillus*.

Кокковидные молочнокислые бактерии выделялись преимущественно из вегетирующих растений, измельченной растительной массы и силоса на начальных этапах брожения. Около 30% молочнокислых бактерий, выделенных на 7-е сутки силосования злаковой травосмеси, были представлены кокками. В микробном ценозе разных вариантов силоса более поздних сроков созревания преобладали палочковидные формы.

Выявлено некоторое возрастание уровня активности кислотообразования выделяемых молочнокислых бактерий по мере увеличения срока хранения силоса из злаковой травосмеси от 1 до 3 месяцев и силоса из кукурузы – от 1 до 2 месяцев. Это может быть обусловлено создающимися селективными условиями для развития ацидофильных микроорганизмов по мере сбраживания растительной массы и повышения в ней уровня активной кислотности.

Таблица – Активность кислотообразования молочнокислых бактерий

Титруемая кислотность, $^{\circ}\text{T}$	Среднее значение титруемой кислотности в группе, $^{\circ}\text{T}$	Среднее значение срока хранения силоса – источника выделения большинства штаммов, сутки	Вариант, из которого выделено большинство штаммов группы
16-48	35,0	9,7	Эпифитная микрофлора
51-100	72,3	46,1	Силосованные корма
101-150	127,0	42,1	Силосованные корма
151-200	179,6	49,2	Силосованные корма
201-246	221,5	83,3	Силосованные корма

Заключение. Проведенные исследования позволили отобрать штаммы с высоким уровнем ацидогенеза и создать коллекцию культур бактерий, перспективных для дальнейшего изучения их с целью отбора для включения в состав бактериальных препаратов для силосования разного растительного сырья.

Как один из приемов повышения эффективности поиска активных кислотообразователей можно рекомендовать рациональный выбор источника выделения молочнокислых бактерий. Штаммы с высоким уровнем ацидогенеза чаще выделяются из силоса более длительного срока хранения.

Список использованных источников

1. Квасников, Е.И. Молочнокислые бактерии и пути их использования / Е.И. Квасников, О.А. Нестеренко. – Москва: Наука, 1975. – 390 с.
2. Методы общей бактериологии / Под ред. Ф. Герхардта и др.– Москва: Мир, 1983. – Т. 1.– 536 с.
3. Man, J.C. A medium for the cultivation of Lactobacilli / J.C. Man, M. Rogosa, M.E. Sharpe // J. Appl. Bacteriol. – 1960. – Vol. 23, № 1. – P. 130–135.
4. Методы общей бактериологии / Под ред. Ф. Герхардта и др.– Москва: Мир, 1984. – Т. 2.– 470 с.