

К. БАЯКЫШОВА, Н. Н. ГАВРИЛОВА, И. А. РАТНИКОВА,

З. Ж. ТУРЛЫБАЕВА, С. Д. ЫБЫШЕВА, Д. ХАМИТОВ

(РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, г. Алматы)

ВЫДЕЛЕНИЕ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ И СОСТАВЛЕНИЕ АССОЦИАЦИЙ ДЛЯ КОНСЕРВИРОВАНИЯ ЗЕЛЕННОЙ МАССЫ ДОННИКА

Аннотация

Из эпифитной микрофлоры донника отобраны 6 штаммов молочнокислых бактерий по способности сбраживать углеводы растительного сырья. По морфологическим, культуральным и физиолого-биохимическим признакам отобранные штаммы отнесены к *Lactobacillus plantarum*. На основании опытов по силосованию зеленой массы донника с использованием составленных ассоциаций установлено, что наиболее приемлемой для этих целей является ассоциация А2, состоящая из *Lactobacillus plantarum*-22 и *Lactobacillus plantarum*-3.

Ключевые слова: донник, молочнокислые бактерии, ассоциации, силосование.

Кілт сөздер: түйе жоңышқа, сүтқышқылды бактериялар, ассоциациялар, силостауға.

Keywords: melilot, lactic acid bacteria, associations, siloing.

Прогрессивными методами приготовления сочных кормов являются сенажирование и силосование [1-4].

Силосование кормов – это микробиологический процесс сбраживания сахаров растений молочнокислыми бактериями до органических кислот (молочной и уксусной).

Научную основу консервирования (силосования) кормов составляет теория «сахарного мини-му́ма» разработанная Мишустиным Е.Н. (1931) [4] и Зубрилиным А.А. (1947) [5]. Источником образования органических кислот служат водорастворимые сахара. В зависимости от соотношения в растениях растворимых сахаров и буферных компонентов авторы теории разделили кормовые культуры на три группы: 1) легкосилосующиеся; 2) трудносилосующиеся; 3) несилосующиеся. Изучаемая нами культура донник относится к группе трудно силосующихся, так как количество водорастворимых сахаров достаточно только для образования минимума молочной кислоты. При использовании донника в корм

необходимо учитывать некоторые его биологические особенности. В отличие от других кормовых растений, он быстро грубеет после цветения. Поэтому на корм донник следует убирать до начала цветения, в период бутонизации. После массового цветения донника, несмотря на незначительное увеличение кормовой массы, количество кормовых единиц на единицу сухого вещества уменьшается. Однако при этом донник для нашего региона является перспективной культурой. Донник – одна из немногих бобовых культур, способных значительно повысить обеспеченность корма белками. Интерес к силосованию донника обусловлен и тем, что он является не только единственным растением, растущим на засоленных почвах, но и способствует рассолению почв.

Дальнейшее распространение донника по сельскохозяйственным угодьям республики сдерживается из-за отсутствия оптимальной технологии кормоприготовления из этого растения. Сено из донника получается некачественным, наблюдаются большие потери корма из-за осыпания листьев. Растительная масса донника – трудносилосуемая из-за малого количества растворимых сахаров. В его составе значительное количество полисахаридов: целлюлозы, гемицеллюлозы, пектиновых веществ. В массе донника мало сбраживаемых сахаров – порядка 2,0-2,5%, что недостаточно для продуцирования органических кислот и снижения рН до уровня 4,2-4,3, необходимого для консервации корма.

Донник как высокорентабельное растение с малым количеством растворимых сахаров плохо силосуется естественной микрофлорой. Поэтому в составе биоконсервантов необходимы микроорган-измы, способные гидролизовать растительные полисахариды и увеличить исходное количество сбраживаемых сахаров, или молочнокислые бактерии, способные быстро утилизировать сахара до такого момента, когда спонтанные микроорганизмы силоса ассимилируют их.

При технологии заготовки сенажа травы надо подвяливать, то есть снижать влажность растительной массы до 50%. В условиях жаркого климата легко пересушить растительную массу, и тогда сенаж не получится. Если в траншею закладывать люцерну с высокой влажностью (60-70%), то сенаж сгниет. При использовании заквасок отпадает необходимость предварительного подсушивания массы, растения с поля закладывают в траншею, обрабатывают закваской и получается хороший корм. Химический состав сенажа из бобовых растений показывает, что обработка биоконсервантом способствует повышению сохранности питательных веществ, их переваримости, а также увеличивает выход кормовых единиц.

При заготовке кормов главная цель состоит в том, чтобы экономно расходуя запас углеводов растений сохранить в нем и довести до животных жизненно важные компоненты питания: белки, жиры, углеводы.

Известны работы, когда для силосования донника были использованы штаммы молочнокислых бактерий: *Streptococcus lactic diastaticus* (АМС), *Lactobacillus plantarum* 34 (Силоплнт-34) и *Cellulomonas flavigena* 22 (ЦЛБ), а также химический консервант - бензойная кислота. Инокуляция растительной массы молочнокислыми бактериями способствует лучшему сохранению азотистой части корма. Тем не менее, в процессе хранения корма протеиновый комплекс подвергается изменениям. Использование

специализированных культур микроорганизмов позволяет направлено регулировать бродильный процесс, с целью рационального использования небольшого количества мобильных форм углеводов с образованием органических кислот, консервирующих корм [5].

Материалы и методы

Объектом исследований являлись выделенные из эпифитной микрофлоры донника штаммы молочнокислых бактерий.

Первоначальный отбор активных штаммов проводили по величине зон разложения мела на сусло-агаре с мелом.

Для выделения наиболее активных штаммов молочнокислых бактерий и определения их биологических свойств использовали следующие питательные среды: травяной отвар с мелом, сусло-агар, капустный агар, среда МРС. Препараты молочнокислых бактерий окрашивали по Граму с дальнейшей микроскопической характеристикой с использованием светового микроскопа.

Молочнокислые бактерии исследовали на способность к сбраживанию углеводов на среде Гисса с мальтозой, глюкозой, ксилозой, арабинозой, сахарозой, лактозой, сорбитом, маннитом, крахмалом, целлюлозой, раффинозой и галактозой. Кислотообразующую активность молочнокислых бактерий определяли по Тернеру и выражали в °Т, значение рН среды измеряли на потен-циометре. Состав и количество органических кислот определяли по методу Вигнера. Для определения способности молочнокислых бактерий усваивать различные формы азота была использована синтетическая среда следующего состава (г/л): NaH_2PO_4 – 1,0; K_2HPO_4 – 1,0; MgSO_4 – 1,0; сахара – 1,0; мел – 20,0. В качестве источников азота в среду вносили пептон, сернокислый аммоний, мочевины, дрожжевой автолизат в разных концентрациях.

Опыты по силосованию растений проводили в лабораторных условиях. Растения измельчали до размера 3-4 см. Степень плотности массы контролировали путем взвешивания на весах. Измельченную растительную массу прессовывали в банки вместимостью 1 л, закрывали пергаментной бумагой и заливали смесью Менделеева, состоящей из парафина и сургуча. Банки с силосной массой хранили при температуре 35°С с различными сроками созревания. В качестве силосной закваски были использованы культуры молочнокислых бактерий, выделенные из эпифитной микрофлоры. Закваски молочнокислых бактерий вносили в опытные варианты в количестве от 10 до 20 тысяч КОЕ на 1 г силосуемой массы. В контрольный вариант закваску не добавляли.

Влажность скошенных трав для силоса определяли на аппарате ВЗМ-1.

По плану эксперимента силос был вскрыт через 1 и 3 мес. с последующим определением численности микроорганизмов, количества органических кислот, рН и наличия аммиака. Определение содержания азотных соединений, численность

микроорганизмов и биохимические показатели (содержание молочной, уксусной и масляной кислот) в силосных образцах были определены по общепринятым методам [6,7]. Для математической обработки результатов были использованы стандартные методы нахождения средних значений и их средних ошибок [8].

Результаты и обсуждение

Выделение молочнокислых бактерий для консервирования зеленой массы донника проводили из смывов с поверхности растений. Для этих целей использовали следующие питательные среды: травяной отвар с мелом, сусло-агар с мелом, капустный агар с мелом. Отсев одиночных колоний проводили в аналогичные жидкие питательные среды. Активные изоляты отбирали по способности кислотообразования при культивировании их в жидком травяном отваре.

Всего выделено 300 изолятов. По кислотообразующей активности в травяном отваре изоляты существенно отличались друг от друга. Слабые кислотообразователи на вторые сутки накапливали 25–40⁰T, а более активные за это же время повышали кислотность среды до 65–90⁰T. Из вышепри-веденного количества изолятов отобрано 50 с высокой кислотообразующей способностью (70–90⁰T). Отобранные изоляты не обладали каталазной активностью. Большинство из них представлены па-лочковидными формами. Способность усваивать наибольшее количество углеводов, в том числе труд-ноусвояемых: ксилозу, арабинозу, крахмал, принята за критерий отбора молочнокислых бактерий. В результате дальнейшего изучения из 50 изолятов отобрано 6 изолятов (№№ 3, 8, 9, 12, 18 и 22).

Штаммы 3, 9, 12, 18, 22 представлены палочками с закругленными концами, прямыми, размером 0,5-0,7x1,0-2,5 мкм, одиночными, парными или в изогнутых цепочках, неподвижными, аспорогенными, грамположительными. Поверхностные колонии плоские, гладкие и ризоидные. Каталазу не образуют. Глюкозу ферментируют без образования газа. При росте на глюконате обра-зуют СО₂. Сбраживают маннозу, фруктозу, ксилозу, арабинозу, галактозу, маннит, дульцит, сор-бит, мальтозу, сахарозу, лактозу, целлобиозу. Не сбраживают рамнозу и раффинозу. Желатин не разжижают. Нитраты не редуцируют. Аммиак не образуют из аргинина. Молоко подкисляют и коагулируют.

На картофельной среде растут слабо, за исключением штаммов 18 и 22 . На среде Гетчинсона с фильтровальной бумагой штаммы 3 не растут, хороший рост отмечен у штаммов 12, 18, 22. Хоро-ший рост на МПБ отмечен у всех штаммов.

По морфологическим, культуральным и физиолого-биохимическим признакам указанные штаммы отнесены к виду *Lactobacillus plantarum*.

Составление ассоциаций для силосования донника проводили из отобранных бактерий и оце-нивали их по способности сбраживать полисахариды, в частности, крахмал. По этим признакам отобраны 2 ассоциации. Ассоциация 1 содержит штаммы *Lactobacillus plantarum* 18 и 12, ассоциация 2 – *Lactobacillus plantarum* 22 и 3.

Силос заложен из зеленой массы донника влажностью 63-64% с применением ассоциаций 1 и 2. Наблюдения за качеством силоса проводили через 1 и 3 месяца.

В силосе спонтанного брожения через 3 месяца обнаружено 0,84% молочной кислоты, 0,72% уксусной (свободной и связанной) и 1,56% суммы кислот. Процент молочной кислоты от суммы кислот составил 53,8%, количество аммиака равнялось 0,09%. В силосе с ассоциацией молочно-кислых бактерий № 1 содержалось 1,32 % молочной кислоты, 0,76% уксусной кислоты, общее количество кислот - 2,06% , процент молочной кислоты от суммы кислот - 64% (таблицы 1, 2).

Таблица 1 – Бродильные процессы в силосе из донника при спонтанном брожении и инокуляции молочнокислых бактерий (срок хранения 3 месяца)

Вариант опыта	Влажность, %	рН	Органические кислоты, %		Кол-во органических кислот, %	Молочная кислота, % от суммы кислот	Микроорганизм, млн КОЕ/г массы	
			Свободная молочная	Уксусная			гнилостные	молочно-кислые
Контроль (спонтанная микрофлора)	63,2	4,5	0,84	$\frac{0,45}{0,27}$	1,56	53,8	0,0002	52,5
Ассоциация 1	64,2	4,5	1,32	$\frac{0,39}{0,35}$	2,06	64,0	0,00002	120
Ассоциация 2	64,6	4,6	1,68	$\frac{0,42}{0,32}$	2,42	69,4	0,000015	45
<i>Примечание.</i> В числителе – свободная, в знаменателе – связанная уксусная кислота.								

Использование ассоциации № 2 позволило получить силос из донника с содержанием 1,68% свободной молочной кислоты, 0,74% свободной и связанной уксусной кислоты, суммы органических кислот 2,42%. Содержание молочной кислоты от суммы молочной кислоты составило 69,4%. При сопоставлении полученных результатов установлено, что по содержанию органических кислот лучшим является силос с ассоциацией № 2. По содержанию аммиака и сохранению общего и белкового азота с различными ассоциациями идентичны (таблица 2).

Таблица 2 – Влияние молочнокислых бактерий на сохранение азотного комплекса при
силосовании донника

(срок хранения 3,0 месяца)

Вариант опыта	Аммиак, %	Азот в воздушно сухом веществе, %	
		Общий	Белковый
Исходная масса	–	6,8	5,9
Контроль (без закваски)	0,092	6,2	4,32
Ассоциация 1	0,058	6,6	4,66
Ассоциация 2	0,58	6,5	4,64

Таким образом, на основании опытов по силосованию зеленой массы донника с использованием отобранных ассоциаций установлено, что наиболее приемлемой для этих целей является ассоциация А 2, состоящая из *Lactobacillus plantarum* -22 и *Lactobacillus plantarum* -3.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Батькаев Р.Я., Росляков Л.А. Технология приготовления сенажа на юго-востоке Казахстана // Изв. АН КазССР. Сер. биол. – 1980. – № 4. – С. 80-85.
- 2 Зубрилин А.А. Силосование и технология кормов. – М.: Колос. – С. 7-14.
- 3 Мещерякова И.П. Некоторые факторы, влияющие на силосуемость растений с различной влажностью // Докл. ВАСХНИЛ. – 1973. – № 2. – С. 6-8.
- 4 Мишустин Е.Н. Научные основы силосования кормов. – М., 1981. – С. 64.
- 5 Саданов А.К. Роль микроорганизмов в повышении урожайности бобовых культур и улучшении качества корма. – Алматы, 2006. – С. 159.
- 6 Методы биохимического исследования силоса. ВИЖ. – М.: Дубровицы, 1967. – 89 с.
- 7 Ермаков А.И., Арасимович В.В. Методы биохимического исследования растений. – Л.: Колос, 1976. – 456 с.
- 8 Урбах В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. – М.: Медицина, 1975. – 296 с.

REFERENCES

- 1 Bat'kaev R.Ja., Rosljakov L.A. Tehnologija prigotovlenija senazha na jugo-vostoke Kazahstana // Izv. AN KazSSR. Ser. biol. – 1980. – № 4. – S. 80-85.
- 2 Zubrilin A.A. Silosovanie i tehnologija kormov. – M.: Kolos. – S. 7-14.
- 3 Meshherjakova I.P. Nekotorye faktory, vlijajushhie na silosuemost' rastenij s razlichnoj vlazhnost'ju // Dokl. VASHNIL. – 1973. – № 2. – S. 6-8.
- 4 Mishustin E.N. Nauchnye osnovy silosovanija kormov. – M., 1981. – S. 64.
- 5 Sadanov A.K. Rol' mikroorganizmov v povyshenii urozhajnosti bobovyh kul'tur i uluchshenii kachestva korma. – Almaty, 2006. – S. 159.
- 6 Metody biohimicheskogo issledovanija silosa. VIZh. – M.: Dubrovicy, 1967. – 89 s.
- 7 Ermakov A.I., Arasimovich V.V. Metody biohimicheskogo issledovanija rastenij. – L.: Kolos, 1976. – 456 s.
- 8 Urbah V.Ju. Statisticheskij analiz v biologicheskikh i medicinskih issledovanijah. – M.: Medicina, 1975. – 296 s.

Резюме

К. Баякышова, Н. Н. Гаврилова, И. А. Ратникова, З. Ж. Турлыбаева, С. Д. Ыбышева, Д. Хамитов

(ҚР БЖҒМ ҒК «Микробиология және вирусология институты» РМК, Алматы қ.)

ТҮЙЕ ЖОҢЫШҚАНЫҢ ЖАСЫЛ МАССАСЫН КОНСЕРВІЛЕУ ҮШІН СҮТ ҚЫШҚЫЛЫ БАКТЕРИЯЛАРЫН БӨЛІП АЛУ ЖӘНЕ АССОЦИАЦИЯ ҚҰРУ

Өсімдіктердің бойындағы көмірсуларды ашыту қабылетіне қарай, түйе жоңышқаның эпифиттік микро-флорасынан сүт қышқылы бактерияларының 6 штамы бөлініп алынды. Морфологиялық, культуральдық және физиолого-биохимиялық белгілеріне қарай, бөлініп алынған штамдар *Lactobacillus plantarum* туысына жатқызылды. Іріктеп алынған ассоциацияларды қосып түйе жоңышқаның көк массасынан сүрлем даярланды және тәжірибенің негізінде, осы мақсатқа сай қолдануға ең қолайлысы *Lactobacillus plantarum*-22 және *Lactobacillus plantarum*-3 тұратын А 2 ассоциациясы болатыны белгілі болды.

Кілт сөздер: түйе жоңышқа, сүтқышқылды бактериялар, ассоциациялар, силостауға.

Summary

K. Bayakyshova, N. N. Gavrilova, I. A. Ratnikova, Z. Zh. Turlybayev, S. D. Ybysheva, D. Hamitov

(«Institute of microbiology and virology» CS MES RK, Almaty)

ALLOCATION OF LACTIC BACTERIA AND DRAWING UP ASSOCIATIONS FOR CONSERVATION OF GREEN MATERIAL OF THE TRIBUTARY

From epifitny microflora melilot of the 6 strains of lactic bacteria on ability use carbohydrates vegetable raw materials are selected. On morphological, cultural and fiziologo-biochemical signs the selected strains are carried to *Lactobacillus plantarum*. On the basis of experiments on siloing of green material of the tributary with use of the selected associations it is established that the most acceptable for these purposes is the A 2 association consisting of *Lactobacillus plantarum*-22 and *Lactobacillus plantarum*-3.

Keywords: melilot, lactic acid bacteria, associations, siloing.

Поступила 02.07.2013 г.