

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

З. Ж. ТУРЛЫБАЕВА, С. Д. ЫБЫШЕВА

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

**СОЗДАНИЕ БИОКОНСЕРВАНТОВ ДЛЯ СИЛОСОВАНИЯ
ЛЮЦЕРНЫ НА ОСНОВЕ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ,
ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЭПИФИТНОЙ МИКРОФЛОРЫ РАСТЕНИЙ**

Аннотация

Из эпифитной микрофлоры люцерны отобраны 3 активных изолята по способности сбраживать наибольшее количество углеводов, в том числе трудноусвояемых: ксилозу, арабинозу, крахмал. По морфологическим, культуральным и физиолого-биохимическим признакам штаммы идентифицированы как *Lactobacillus plantarum*. По способности сбраживать углеводы растительного сырья отобраны штаммы молочнокислых бактерий в состав ассоциаций, предназначенных для силосования зеленой массы люцерны. Составлены и испытаны 2 ассоциации на основе молочнокислых бактерий. Ассоциация 1 содержит *Lactobacillus plantarum* 6 и 45, ассоциация 2 – *Lactobacillus plantarum* 22 и 3. На основании опытов по силосованию зеленой массы люцерны с использованием отобранных ассоциаций установлено, что наиболее приемлемой для этих целей является ассоциация 2.

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

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

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

В связи с развитием животноводства в республике возрастает потребность в кормах. Этот вопрос может решаться за счет укрепления кормовой базы на основе максимального использования прогрессивных способов заготовки и хранения растительных кормов, что позволяет резко снизить потери питательных веществ, достигающих в обычных условиях заготовки до 25-30%, а это требует совершенствования существующих и разработки новых способов заготовки и хранения кормов. В этом отношении наиболее выгодным приемом получения кормов из растительного сырья является силосование [1-4].

Микробиологические процессы приготовления качественного силоса основаны на использовании, главным образом, молочнокислых бактерий, активность которых зависит от наличия в силосуемом сырье достаточного количества легкодоступных форм

углеводов, обеспечивающих процесс молочнокислого брожения и накопления органических кислот в консервируемых кормах [5]. Однако силосуемые растения не всегда соответствуют подобным требованиям. Так, бобовые культуры (люцерна, соя и донник) содержат большое количество азотных соединений при низком содержании углеводов. Такие растения лучше силосовать в смеси с высокосахаристыми растениями или же при их силосовании использовать бактериальные закваски, способные сбраживать трудноусвояемые углеводы, такие как декстрины, крахмал.

В связи с этим нами запланированы исследования по созданию биоконсерванта для силосования люцерны на основе молочнокислых бактерий, выделенных из эпифитной микрофлоры растений.

Материалы и методы

Объектом исследований являлись выделенные из эпифитной микрофлоры штаммы молочно-кислых бактерий.

После очистки молочнокислых бактерий от посторонней микрофлоры с последующей идентификацией были отобраны наиболее активные штаммы. Отбор 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 из отобранных молочнокислых бактерий окрашивали по Граму с дальнейшей микроскопической характеристикой с использованием светового микроскопа.

Молочнокислые бактерии исследовали на способность к сбраживанию углеводов на среде Гис-са 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 потенциометре. 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; сахароза – 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°C 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 силосной массы. В контрольный вариант закваску не добавляли.

По плану эксперимента силос был вскрыт через 1 и 3 мес. с последующим определением численности микроорганизмов, количества органических кислот, рН и наличия аммиака. Влажность скошенных трав для силоса определяли на аппарате ВЗМ-1. Определение содержания азотных соединений по методике. Численность микроорганизмов и биохимические (содержание молочной, уксусной и масляной кислот) показатели 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

Высев молочнокислых бактерий для консервирования зеленой массы люцерны проводили из смывов с поверхности растений на сусло-агар с мелом и 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 250 изолятов. По кислотообразующей активности в травяном отваре изоляты существенно отличались друг от друга. Слабые кислотообразователи на вторые сутки накапливали 25-40⁰Т, а более активные за это же время повышали кислотность среды до 65-90⁰Т. Из выше-приведенного количества изолятов отобрано 50 с высокой кислотообразующей способностью (70-90⁰Т). Отобранные изоляты не обладали каталазной активностью. Большинство из них представлено палочковидными формами. Способность усваивать наибольшее количество углеводов, в том числе трудноусвояемых: ксилозу, арабинозу, крахмал, принята за критерий отбора молочнокислых бактерий. В результате дальнейшего изучения отобрано 3 изолята №№ 6, 7 и 45.

Штаммы 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 образуют СО₂. Сбраживают маннозу, фруктозу, ксилозу, арабинозу, галактозу, маннит, дульцит, сорбит, 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 штамма 45. На среде Гетчинсона с фильтровальной бумагой штамм 6 не растет, слабый рост отмечен у штамма 7, хороший – у штамма 45. Хороший рост на МПБ отмечен у всех штаммов.

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

Хранение силоса 1 месяц								
Контроль (спонтанная микрофлора)	68,0	4,5 3	1,06	<u>0,55</u> 0,45	2,06	51,4	0,0008	16600
Ассоциация 1	67,5	4,4 9	1,08	<u>0,39</u> 0,28	1,75	61,7	0,0015	18000
Ассоциация 2	67,0	4,3 2	1,55	<u>0,32</u> 0,28	2,15	72	0,0022	19200
Хранение силоса 3 месяца								
Контроль (спонтанная микрофлора)	66,5	4,5	1,04	<u>0,53</u> 0,50	2,07	50,2	0,002	72,5
Ассоциация 1	66,3	4,8	1,20	<u>0,62</u> 0,48	2,30	52,2	0,002	137
Ассоциация 2	67,5	4,5	1,54	<u>0,32</u> 0,32	2,18	70,6	0,0017	2
<i>Примечание.</i> В числителе – свободная, в знаменателе – связанная уксусная кислота.								

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

Вариант опыта	Аммиак, %	Азот в воздушно-сухом веществе, %	
		Общий	Белковой
Исходная масса	–	2,58	2,3
Силос			
Контроль (спонтанная микрофлора)	<u>0,081</u> 0,092	2,69	1,82
Ассоциация 1	<u>0,077</u>	2,69	1,90

	0,084		
Ассоциация 2	<u>0,052</u> 0,054	2,66	2,03
<i>Примечание. Вв числителе – силос со сроком хранения 1 месяц, в знаменателе – 3.</i>			

Кроме того, следует отметить, что во всех вариантах силоса преобладали молочнокислые бактерии. Микроскопических грибов и дрожжей не обнаружено.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Зубрилин А.А., Мишустин Е.Н. Силосование кормов. – М.: Колос, 1958. – 228 с.
- 2 Шамис Д.Л., Ильина К.А. Роль бактериальных заквасок в регулировании процесса кислотообразования в силосе // Тр. Ин-та микробиологии и вирусологии. АН КазССР. – 1961. – Т. 5. – С. 51-57.
- 3 Таранов М.Т. Химическое силосование кормов. – М.: Колос, 1964. – 200 с.
- 4 Утеуш Ю.А. Новые перспективные кормовые культуры. – Киев: Наукова Думка, 1991. – 145 с.
- 5 Исенжулов Б.А. Влияние бензойной кислоты и ее сочетания с молочнокислыми бактериями на микробиологические и биохимические процессы в силосах: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Алма-Ата, 1982. – 26 с.
- 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 Zubrilin A.A., Mishustin E.N. Silosovanie kormov. – M.: Kolos, 1958. – 228 s.
- 2 Shamis D.L., Il'ina K.A. Rol' bakterial'nyh zakvasok v regulirovanii processa kislotoobrazovaniya v silose // Tr. In-ta mikrobiologii i virusologii. AN KazSSR. – 1961. – T. 5. – S. 51-57.
- 3 Taranov M.T. Himicheskoe silosovanie kormov. – M.: Kolos, 1964. – 200 s.

4 Uteush Ju.A. Novye perspektivnye kormovye kul'tury. – Kiev: Naukova Dumka, 1991. – 145 s.

5 Isenzhulov B.A. Vlianie benzojnoj kisloty i ee sochetanija s molochnokislymi bakterijami na mikrobiologicheskie i biohimicheskie processy v silosah: Avtoref. dis. ... kand. biol. nauk. – Alma-Ata, 1982. – 26 s.

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

Н. Н. Гаврилова, И. А. Ратникова, К. Баякышова,

З. Ж. Тұрлыбаева, С. Д. Ыбышева

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

ӨСІМДІКТЕРДІҢ ЭПИФИТТІ МИКРОФЛОРАСЫНАН БӨЛІНІП АЛЫНҒАН СҮТҚЫШҚЫЛДЫ БАКТЕРИЯЛАРДЫҢ НЕГІЗІНДЕ ЖОҢЫШҚАНЫ СИЛОСТАУҒА АРНАЛҒАН БИОКОНСЕРВАНТТАРДЫ ЖАСАУ

Жоңышқаның эпифитті микрофлорасынан көмірсуды едәуір ашыта алатын қасиетіне байланысты 3 белсенді изолят тандалынып алынды. Оған қоса ауыр қортылатын ксилоза, арабиноза және крахмал алынды. Морфологиялық, культуралдық және физиолого-биохимиялық сипаттарына қарағанда бұл штамдар *Lacto-bacillus plantarum* болып шықты. Өсімдіктегі көмірсуды ашыта алу қасиетіне қарағанда сүтқышқылды бактериялардың штамдары тандалынып алынды. Ол жасыл жоңышқа салмағын силостауға арналған бактерияларды ассоциация құрамына алынды. Сүтқышқылды бактериялардың негізінде 2 ассоциация бөлініп алынып, сыналды. 1ші ассоциация *Lactobacillus plantarum* 6 және 4, 2ші ассоциация- *Lactobacillus plantarum* 22 және 3 бактерияларынан тұрады. Тәжірибе нәтижесінде жасыл жоңышқа салмағын силостауға арналған арнайы тандалынып алынған ассоциациялар ішінде 2ші ассоциация неғұрлым тиімдісі болып табылды.

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

Summary

N. N. Gavrilova, I. A. Ratnikova, K. Bayakysheva,

Z. Zh. Turlybaeva, S. D. Ibysheva

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

CREATION OF BIOPRESERVATIVES FOR SILOING OF LUCERNE ON THE BASIS OF THE LACTIC BACTERIA ALLOCATED FROM EPIFITNA OF MICROFLORA OF PLANTS

From natural microflora of a lucerne 3 active isolates on ability use the greatest number of carbohydrates, including the hardly used are selected: xylose, arabinose, starch. On morphological, cultural and fiziologo-biochemical signs strains are identified as *Lactobacillus plantarum*. On ability use carbohydrates of vegetable raw materials are selected strains of lactic bacteria in structure of the associations intended for siloing of green material of a lucerne. 2 associations on the basis of lactic bacteria are made and tested. The association 1 contains *Lactobacillus plantarum* 6 and 45, association 2 - *Lactobacillus plantarum* 22 and 3. On the basis of experiments on siloing of green material of a lucerne with use of the selected associations it is established that the most acceptable for these purposes is the association 2.

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

Поступила 24.06.2013 г.