

**ИЗУЧЕНИЕ РЕГИОНАЛЬНЫХ ШТАММОВ ЛАКТОБАЦИЛЛ
И ВВЕДЕНИЕ ИХ В СОСТАВ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЗАКВАСКИ
ДЛЯ БИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ КОРМОВ****THE STUDY OF REGIONAL STRAINS OF LACTOBACILLI AND THEIR INTRODUCTION
INTO THE BACTERIAL STARTER CULTURE FOR FORAGE BIOCONSERVATION**

Ключевые слова: молочнокислые и пропионово-кислые бактерии, штаммы, микробиологический процесс, бактериальные закваски для биоконсервирования кормов для животных, селекция лактобацилл, ферментация углеводов, антагонистическая активность, осмоотолерантность, биологическая совместимость.

Развитие промышленного животноводства невозможно без создания прочной кормовой базы. Одним из лучших способов заготовки кормов является приготовление сенажа и силоса. Силосованные корма охотнее поедаются скотом, улучшают пищеварение, благотворно влияют на здоровье животных, повышают их продуктивность. Особенно ярко это проявляется в зимне-весенний сезон года. В основе силосования лежит сложный микробиологический процесс. Он протекает в несколько этапов. Ведущая роль в этом процессе принадлежит лактобактериям (молочнокислым бактериям). Лактобактерии потребляют углеводы и образуют молочную кислоту, являющуюся отличным консервантом. Однако одновременно с этим в растительной массе устанавливается высокое осмотическое давление, крайне неблагоприятное для жизнедеятельности лактобактерий. Поскольку в эпифитной микрофлоре, как правило, наблюдается острый дефицит молочнокислых бактерий, устойчивых к осмотическому давлению, кислотообразование в силосуемой массе не достигает необходимого уровня, развивается вторичное брожение, снижаются выход и качество силоса. Применение силосных заквасок для биоконсервирования кормов, составленных с учетом способности молочнокислых бактерий «работать» при повышенном осмотическом давлении, будет давать положительный эффект. В лаборатории микробиологии молока и молочных продуктов СибНИИС ФГБНУ ФАНЦА в течение многих лет ведутся исследования, направленные на создание специализированных заквасок для силосования кормов. В данной статье приведены результаты исследования по отбору мезофильных лактобацилл с подходящими биотехнологическими свойствами: отбор гомоферментативных штаммов, тест на осмоотолерантность и другие тех-

нологически ценные свойства молочнокислых бактерий. Среди исследованных штаммов мезофильных лактобацилл «растительного» происхождения выявили штаммы с повышенной осмоотолерантностью. Осмоотолерантные штаммы более активно подкисляли растительный субстрат (пшеничные отруби) с влажностью 50%, чем штаммы с низкой осмоотолерантностью. Активные осмоотолерантные штаммы лактобацилл вошли в состав разрабатываемых бактериальных заквасок для биоконсервирования кормов.

Keywords: lactic and propionic bacteria, strains, microbiological process, bacterial starters for forage bioconservation, selection of lactobacilli, carbohydrate fermentation, antagonistic activity, osmotic tolerance, biological compatibility.

The development of commercial animal husbandry is impossible without creating reliable forage supply. Haylage and silage making is one of the best ways of forage conservation. Ensilaged forages are more readily eaten by livestock and they improve digestion, have a beneficial effect on animal health and increase animal performance. This is especially evident in the winter and spring seasons. Silage-making is based on a complex microbiological process. It proceeds in several stages. The leading role in this process belongs to lactobacilli (lactic-acid bacteria). Lactic-acid bacteria consume carbohydrates and form lactic acid which is an excellent preservative. However, at the same time, high osmotic pressure develops in the plant herbage which is extremely unfavorable for the life of lactobacilli. Since the epiphytic microflora usually has an acute deficit of lactic-acid bacteria resistant to osmotic pressure, acid formation in the silage mass does not reach the required level, secondary fermentation develops, and the yield and quality of silage decreases. The use of silage starters for forage bioconservation made up taking into account the ability of lactic-acid bacteria to “work” at high osmotic pressure will have a positive effect. The staff of the Milk and Dairy Product Microbiology Laboratory of the Siberian Research Institute of Cheese-Making (Federal Altai Scientific Center of Agro-Biotechnologies) has

been conducting a long-term research aimed at the creation of special starter cultures for silage-making. This paper discusses the research findings on the selection of mesophilic lactic-acid bacteria with suitable biotechnological properties: the selection of homofermentative strains, osmotic tolerance test, etc. Among the studied strains of mesophilic lactobacilli of "plant" origin, the

strains with increased osmotic tolerance were identified. Osmotic tolerant strains more actively acidified the plant substrate (wheat bran) with moisture content of 50% than the strains with lower osmotic tolerance. Active osmotic tolerant strains of lactobacilli are a part of the bacterial starters being developed for forage bioconservation.

Отт Екатерина Федоровна, к.б.н., вед. н.с. лаб. микробиологии молока и молочных продуктов, отдел СибНИИС, Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий, г. Барнаул. E-mail: katya.ott.49@mail.ru.

Орлова Татьяна Николаевна, н.с. лаб. микробиологии молока и молочных продуктов, отдел СибНИИС, Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий, г. Барнаул. E-mail: orlova_tn_92@mail.ru.

Функ Ирина Андреевна, м.н.с., лаб. микробиологии молока и молочных продуктов, отдел СибНИИС, Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий, г. Барнаул. E-mail: funk.irishka@mail.ru.

Дорофеев Роман Викторович, к.с.-х.н., с.н.с., лаб. микробиологии молока и молочных продуктов, отдел СибНИИС, Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий, г. Барнаул. E-mail: romandorof@yandex.ru.

Ott Yekaterina Fedorovna, Cand. Bio. Sci., Leading Staff Scientist, Milk and Dairy Product Microbiology Lab., Federal Altai Scientific Center of Agro-Biotechnologies, Barnaul. E-mail: katya.ott.49@mail.ru.

Orlova Tatyana Nikolayevna, Staff Scientist, Milk and Dairy Product Microbiology Lab., Federal Altai Scientific Center of Agro-Biotechnologies, Barnaul. E-mail: orlova_tn_92@mail.ru.

Funk Irina Andreyevna, Junior Staff Scientist, Milk and Dairy Product Microbiology Lab., Federal Altai Scientific Center of Agro-Biotechnologies, Barnaul. E-mail: funk.irishka@mail.ru.

Dorofeyev Roman Viktorovich, Cand. Agr. Sci., Senior Staff Scientist, Milk and Dairy Product Microbiology Lab., Federal Altai Scientific Center of Agro-Biotechnologies, Barnaul. E-mail: romandorof@yandex.ru.

Введение

Многолетний мировой опыт убедительно доказал высокую эффективность применения бактериальных заквасок при биоконсервировании кормов. Применение бактериальных заквасок позволяет изменить исходный состав естественной микрофлоры зеленой массы в пользу полезной микрофлоры и таким образом с самого начала направить микробиологический процесс в нужную сторону. Для получения высококачественного силоса необходимо создать в силосуемой массе благоприятные условия для жизнедеятельности лактобактерий и предотвратить развитие вредной микрофлоры: плесневых грибов, гнилостных бактерий, бактерий группы кишечных палочек, клостридий и др. [1]. Из нежелательной микрофлоры наибольший ущерб качеству силоса наносят клостридии вида *Clostridium tyroburicum* (маслянокислые бактерии). Для характеристики силоса ис-

пользуют отношение концентрации масляной и молочной кислот. Если это отношение больше или равно 0,5, то силос называют «клостридиальным». При скармливании такого силоса лактирующим коровам молоко сильно обсеменяется спорами клостридий и становится непригодным для сыроделия, так как они являются виновниками вспучивания твердых и полутвердых сыров [2, 3]. Бактериальные закваски для силосования кормов, в состав которых вводят штаммы лактобацилл, обладающих специфическим антагонизмом по отношению к технически вредным, санитарно-показательным и патогенным микроорганизмам, дают возможность получить силос высокого качества.

В настоящее время на рынке можно встретить различные бактериальные закваски и препараты для силосования кормов. Все они содержат большой ассортимент живых культур, а именно: лактобациллы, лак-

тококки, пропионовокислые бактерии и другие микроорганизмы, из которых наиболее часто используемыми культурами являются молочнокислые палочки видов *Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus casei*.

Установлено, что введение в растительную массу специально подобранных штаммов лактобацилл (по основным технологически ценным свойствам: кислотообразование, сбраживание сахаров, осмоотолерантность, биосовместимость, антагонизм др.) сокращает продолжительность ранней стадии процесса силосования, способствует интенсивному и стабильному ходу молочнокислого брожения и повышает выход и питательную ценность кормов [4-6]. Для улучшения качественных показателей силоса дополнительно в состав заквасок наряду со штаммами молочнокислых бактерий видов *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* вводят пропионовокислые бактерии вида *P. freudenreichii* spp. *shermanii*, *globosum*. Пропионовокислые бактерии, входящие в состав заквасочного комплекса, эффективно продуцируют молочную, уксусную и пропионовую кислоты, которые подавляют рост нежелательной микрофлоры. Кроме того, они обогащают силос витаминами группы В, в том числе витамином В₁₂, содержание которого в кормах крайне недостаточно. Витамин В₁₂ называют «фактором животного белка», поскольку он повышает усвоение растительных белков у животных [7].

В лаборатории микробиологии молока и молочных продуктов ФГБНУ ФАНЦА трудом сотрудников создана «Сибирская коллекция микроорганизмов» (СКМ) различных групп полезных микроорганизмов (лактококки, лейкопасты, лактобациллы, бифидобактерии, пропионовокислые бактерии), которые были выделены из различных природных источников. В настоящее время в лаборатории

ведутся исследования по отбору перспективных молочнокислых бактерий для включения их в состав бактериальных препаратов для производства ферментированных молочных продуктов и новых бактериальных заквасок для биоконсервирования кормов.

Цель работы – изучение региональных штаммов лактобацилл по основным биотехнологическим свойствам (кислотообразующая активность осмоотолерантность, сбраживание углеводов, антагонизм к технически вредной микрофлоре, биосовместимость) и включение наиболее эффективных штаммов в состав разрабатываемых бактериальных заквасок для биоконсервирования кормов.

Материалы и методы

Исследования проведены в лаборатории микробиологии молока и молочных продуктов отдела СибНИИС. Объектом исследования служили штаммы лактобацилл видов *Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus casei*, которые были выделены ранее из эпифитной микрофлоры кормовых растений Алтайского края.

В работе были применены классические методы микробиологического и биохимического анализа.

Кислотообразующую активность – важнейший технологический параметр лактобацилл, определяли путем культивирования штаммов в травяных отварах с последующим измерением активной кислотности (ед.рН) культуральной жидкости.

Осмоотолерантность лактобацилл изучали по их способности расти и продуцировать молочную кислоту в отрубном отваре с концентрациями поваренной соли (0-10%).

Сбраживание углеводов определяли по изменению активной кислотностью (ед. рН) жидкой питательной среды с углеводом после культивирования на ней лактобацилл.

Антагонизм лактобацилл к условно-патогенным микроорганизмам *E. Coli* 113-3 устанавливали методом «желобка» на чашках Петри с агаризованной средой. В «желобок» заливали в течение 18 ч культуру лактобацилл и затем перпендикулярными штрихами подводили разведения тест-культуры 113-3. По степени роста тест-культуры определяли антагонистическую активность лактобацилл.

Биологическую совместимость штаммов лактобацилл определяли методом отсроченного антагонизма. Каждый штамм засеивали штрихом на поверхность плотной питательной среды и после культивирования на чашках Петри подсеивали тестируемые штаммы. Антагонизм определяли по наличию в местах подсева тестируемых культур зоны с отсутствием или наличием их роста. Биологически совместимыми считали штаммы, не образующие взаимных зон угнетения роста на агаровых тест-средах и не проявляющие ослабления скорости кислотообразования при опытном силосовании кормов комбинациями штаммов по сравнению с индивидуальным использованием.

Результаты и обсуждение

Определение кислотообразующей активности. Кислотообразующая активность – это одно из основных технологических свойств отбираемых штаммов лактобацилл. В результате проведенных исследований из 200 штаммов лактобактерий, выделенных ранее, выявили 75 мезофильных лактобацилл, способных активно подкислять растительные субстраты. Активные штаммы за 20 ч культивирования при температуре 30°C снижали активную кислотность травяного бульона с 5,8 до 4,95 ед. рН, а в опытных вариантах при силосовании трав модельный

силос получали с кислотностью 5,0-5,1 ед. рН.

В силосные закваски включают штаммы лактобацилл с гомоферментативным типом молочнокислого брожения, так как они эффективно и быстро снижают рН силоса [4, 8].

Ферментация углеводов. При подборе лактобацилл в состав заквасок для силосования кормов предпочтение отдается штаммам, которые активно ферментируют углеводы растительного происхождения. Известно, что многие ценные кормовые виды растений (например, бобовые) из-за отсутствия необходимого уровня легкодоступных углеводов относятся к трудносилосуемым культурам. Поэтому для силосования таких растительных субстратов необходимо использовать лактобактерии, которые будут сбраживать, помимо гексоза, также пентозы и полисахариды. В наших исследованиях при изучении спектра ферментации углеводов выявлены штаммы лактобацилл, ферментирующие углеводы, наиболее распространенные в кормовых растениях, а также пентозосбраживающие штаммы и штаммы, обладающие амилазной активностью. Такие штаммы чаще встречались среди лактобацилл, выделенных из растений. В таблице показаны результаты ферментации углеводов мезофильными лактобациллами.

Антагонистическая активность. Наличие специфического антагонизма придает лактобациллам конкурентное преимущество в их взаимоотношениях с технической вредной микрофлорой силоса и, таким образом, способствует повышению качества консервируемых кормов [4, 9]. Молочнокислые лактобациллы (75 штаммов), которые активно подкисляли растительные субстраты, проверили на наличие и уровень антагонистической активности в отношении 4 тест-штаммов *Escherichia coli*. В результате про-

веденных исследований было выявлено, что большинство исследованных штаммов (86,7% от общего числа) проявляют в той или иной степени антагонистическую активность в отношении тест-штаммов кишечных палочек, а часть штаммов (16%) обладает высоким уровнем антагонизма.

Осмолерантность. Обычные силосные закваски оказываются малоэффективными в условиях повышенного осмотического давления. Поэтому при заготовке растительных кормов с пониженной влажностью в состав биоконсервантов включают осмолерантные штаммы лактобацилл [1]. Нами были проведены исследования по изучению осмолерантности у отобранных штаммов мезофильных лактобацилл. Для большинства исследованных штаммов (64,6% от общего числа) солеустойчивость ограничилась 4-6%-ной концентрацией NaCl. Четвертая часть штаммов проявила более высокую солеустойчивость (8%). Среди «силосных» штаммов лактобацилл обнаружено два штамма с очень высоким уровнем солеустойчивости – 10%.

По результатам исследований были отобраны осмолерантные штаммы, устойчивые к присутствию в среде 8-10% соли. В опытных вариантах при силосовании пше-

ничных отрубей с влажностью 50% были получены положительные результаты. Отобранные осмолерантные штаммы лактобацилл показали преимущество над осмочувствительными штаммами в скорости подкисления субстрата.

Биологическая совместимость. При разработке биоконсервантов учитывали биологическую совместимость как между штаммами лактобацилл, так и между штаммами лактобацилл и пропионовокислых бактерий, включаемых в состав закваски для силосования кормов. В результате проведенных исследований отобранные 10 штаммов лактобацилл показали биологическую совместимость и не подавляли рост друг к другу и были биологически совместимыми с многоштаммовой культурой пропионовокислых бактерий.

Выделенные из растительных трав мезофильные лактобациллы и отобранные по технологически ценным свойствам (ферментация углеводов, антагонистическая активность, осмолерантность, биологическая совместимость), а также штаммы пропионовокислых бактерий из коллекции СКМ вошли в фонд для разработки новых перспективных заквасок для биоконсервирования кормов на территории Алтайского края.

Таблица

Сбраживание углеводов лактобациллами

Всего штаммов	Количество лактобацилл, ферментирующих углеводы									
	арабиноза	крахмал	ксилоза	d-манноза	рамноза	раффиноза	рибоза	сахароза	сорбоза	целлюлоза
75	47	50	7	75	0	26	0	70	0	73

Библиографический список

1. Победнов, Ю. А. Силосование трав с использованием новых бактериальных препаратов / Ю. А. Победнов – Текст: непосредственный // Зоотехния. – 1998. – № 6. – С. 12-24.
2. Гудков, А.В. Сыроделие: технологические, биотехнологические и физико-химические аспекты. – Москва: ДеЛи принт, 2003. – 279 с. – Текст: непосредственный.
3. Leibensperger, R.Y., Pitt, R.E. (1987). A model of clostridial dominance in ensilage. *Grass and Forage Science*. 42: 297-317. Doi: 10.1111/j.1365-2494.1987.tb02118.x.
4. Квасников, Е. И. Молочнокислые бактерии и пути их использования / Е. И. Квасников, О. А. Нестеренко. – Москва: Наука, 1975. – 392 с. – Текст: непосредственный.
5. Каган, Я. Р. Селекция осмотолерантных штаммов мезофильных лактобацилл / Я. Р. Каган, Е. Ф. Отт, И. Я. Сергеева, Е. С. Кожина. – Текст: непосредственный // Современные проблемы техники и технологии переработки молока: сборник научных трудов / СибНИИС. – Барнаул, 2005. – С. 95-101.
6. Тищенко, П. И. Силосование с пробиотическим препаратом на основе лактобацилл / П. И. Тищенко, А. М. Корвяков, Е. С. Петраков. – Текст: непосредственный // Проблемы биологии продуктивных животных. – 2014. – № 4. – С. 56-62.
7. Воробьева, Л. И. Пропионовокислые бактерии / Л. И. Воробьева. – Москва: Изд-во МГУ, 1995. – 288 с. – Текст: непосредственный.
8. Евтефеев, Ю. В. Кормопроизводство / Ю. В. Евтефеев. – Барнаул: Изд-во АГАУ, 2001. – 360 с. – Текст: непосредственный.

9. Лаптев, Г. Ю. Методические рекомендации по применению силосной закваски / Г. Ю. Лаптев, В. В. Солдатова, С. С. Брянцев, А. В. Веселов. – Санкт-Петербург, 2001. – 7 с. – Текст: непосредственный.

References

1. Pobednov Yu.A. Silosovanie trav s ispolzovaniem novykh bacterialnykh preparatov // *Zootekhnika*. – 1998. – No. 6. – S. 12-24.
2. Gudkov A.V. Syrodelle: tekhnologicheskie, biotekhnologicheskie i fiziko-khimicheskie aspekty. – Moskva: Izd-vo DeLi print, 2003. – 279 s.
3. Leibensperger, R.Y., Pitt, R.E. (1987). A model of clostridial dominance in ensilage. *Grass and Forage Science*. 42: 297-317. Doi: 10.1111/j.1365-2494.1987.tb02118.x.
4. Kvasnikov E.I., Nesterenko O.A. Molochnokislye bakterii i puti ikh ispolzovaniya. – Moskva: Izd-vo «Nauka», 1975. – 392 s.
5. Kagan Ya.R. Seleksiya osmotolerantnykh shtammov mezofilnykh laktobatsill / Ya.R. Kagan, E.F. Ott, I.Ya. Sergeeva, E.S. Kozhina // *Sovremennye problemy tekhniki i tekhnologii pererabotki moloka: sb. nauch. tr./ SibNIIS*. – Barnaul, 2005. – S. 95-101.
6. Tishchenkov P.I., Korvyakov A.M., Petrakov E.S. Silosovanie s probioticheskim preparatom na osnove laktobatsill // *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh*. – 2014. – No. 4. – S. 56-62.
7. Vorobeveva L.I. Propionovokislye bakterii. – Moskva: Izd-vo MGU, 1995. – 288 s.
8. Evtefeev Yu.V. Kormoproizvodstvo. – Barnaul: Izd-vo AGAU, 2001. – 360 s.
9. Laptev G.Yu. Metodicheskie rekomendatsii po primeneniyu silosnoy zakvaski / G. Yu. Laptev, V.V. Soldatova, S.S. Bryantsev, A.V. Veselov. – Sankt-Peterburg, 2001. – 7 s.

