

*С.Л. Василенко, к.б.н., Н.И. Петрушеня, Н.Н. Фурик, к.т.н.
РУП «Институт мясо-молочной промышленности»*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ БАКТЕРИЙ р. LACTOBACILLUS ДЛЯ СОЗДАНИЯ БИОКОНСЕРВАНТА НА ИХ ОСНОВЕ

Анализ физиолого-биохимических особенностей бактерий р. Lactobacillus позволил разработать критерии отбора микроорганизмов для создания с их использованием консорциумов для биологического консерванта для силосования. Выбраны перспективные для использования в составе биоконсерванта «Биоплант» штаммы Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus plantarum и Lactobacillus casei, удовлетворяющие разработанным критериям отбора.

Введение. В настоящее время важнейшей проблемой сельскохозяйственной науки и практики является сокращение потерь питательных веществ при консервировании зеленых растений и получение из них кормов, незначительно отличающихся по кормовым достоинствам от исходного сырья, пригодных для длительного хранения без значительных потерь питательных веществ и снижения качества [1].

В последние годы наряду с применением химических консервантов, ингибирующих ферментацию в силосуемой массе, ведется поиск новых экологически чистых, безвредных, простых в обращении добавок, которые регулируют и стимулируют микробиологические процессы, протекающие при силосовании кормов. Большой интерес в этом отношении представляют биологические препараты на основе молочнокислых бактерий, поскольку именно данные микроорганизмы за счет молочнокислого брожения наиболее эффективно трансформируют углеводы из растительной массы в молочную кислоту [2].

Спектр биоконсервантов, представленный на белорусском рынке, весьма ограничен [3]. Как видно из табл. 1, в Республике Беларусь производятся только четыре вида биологического консерванта, причем только в жидкой форме, все сухие биоконсерванты импортируются. Таким образом, создание нового биологического консерванта на основе молочнокислых микроорганизмов является актуальной задачей, поскольку

ку позволит сократить ввоз импортных аналогов и заготавливать силос с высокой концентрацией питательных веществ.

Таблица 1 – Биоконсерванты, зарегистрированные в Республике Беларусь

Биоконсервант	Фирма-изготовитель	Микроорганизмы, входящие в состав биоконсерванта	Форма выпуска
Лаксил	Институт микробиологии НАН Беларуси	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Жидкий
Силлактим	Институт микробиологии НАН Беларуси	<i>Lactobacillus sp.</i>	Жидкий
Лактофлор	Витебская биофабрика	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactococcus lactis ssp.</i>	Жидкий
Биоконсервант для силосования растительной массы (ТУ РБ 00028493.476–99)	РУП «Институт мясо–молочной промышленности»	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactococcus lactis ssp.</i>	Жидкий
Биотроф (закваска)	ООО «Биотроф», Россия	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Жидкий
Биомакс 5	«Христиан Хансен», Дания	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Сухой
BonSilage	Schaumann, Германия	<i>Lactobacillus ramnosus</i> , <i>Enterococcus faecium</i>	Сухой
Bio–Sil	EPER Tech., Германия	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Сухой
Микробелсил	«Медиофарм», Словакия	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Enterococcus faecium</i>	Сухой

Цель работы – разработка критериев селекции микроорганизмов для биоконсерванта, обеспечивающего оптимальное соотношение органических кислот и высокую сохранность питательных веществ при заготовке растительных кормов.

Материалы и методы исследований. Объектами исследований являлись штаммы лактобацилл (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus casei*), из которых 10 штаммов из Централизованной отраслевой коллекции промышленных штаммов молочнокислых бактерий (364 LA–AVF, 2389 TL–AV, 1186 LA–AVF, 1190 ML–AF, 2593 ML–AF, 1964 ML–F, 1180 ML–OF, 1157 ML–AF, 1188 ML–OF, 1189 ML) и 29 штаммов лактобацилл, предназначенных для пополнения коллекции (a1, a4, a9, a12, a16, a11, a14, pl 1, pl 2, pl 3, pl 4, pl 5, pl 6, pl 7, pl 8, pl 9, pl 10, pl 12, pl 14, pl 15, pl 16, pl 21, pl 22, pl 27, pl 30/2, cas3, cas4/1, cas4/2, cas 6).

Культивирование микроорганизмов осуществляли в MRS-среде [4], содержащей 0,15% агара (в пробирках) и 1,5% агара (в чашках Петри). Инкубировали в термостате при 32 ± 2 °С (для мезофильных лактобацилл) и при 37 ± 2 °С (для термофильных лактобацилл).

Измерение pH проводили по ГОСТ 26781–85.

Для определения антагонистической активности бактерий использовали метод отсроченного антагонизма. Для этого на поверхность агаризованной MRS-среды в чашке Петри штрихом высевали испытуемый штамм бактерий, который инкубировали в течении 24 ч при 37 °С, после чего перпендикулярным штрихом наносили (16±2)-часовые тест-культуры условно-патогенных микроорганизмов (*Escherichia coli*) и/или маслянокислых микроорганизмов (*Clostridium tyrobutyricum*), которые инкубировали в термостате в течении 48 ч. Об уровне антагонистической активности исследуемых штаммов судили по зонам задержки роста тест-культур [5].

Способность бактерий расти при различной pH-среде определяли следующим образом. Бактериальные культуры лактобацилл выращивали в течении 16±2 ч в среде MRS, после чего по 100 мкл бактериальной суспензии клеток вносили в 10 мл среды MRS с pH 3,8, 4,0 и 4,2. Инкубировали в течении 48–72 ч при оптимальной температуре.

Для определения осмолоерантности по 30 г измельченного растительного материала помещали в 2 стерильные емкости и заливали 100 мл 10%-ным раствором хлорида калия с добавлением 0,5–1% сахарозы (для имитации провяливания массы до содержания 45% сухого вещества). В одну емкость добавляли 3% (16±2)-часовой культуры исследуемых микроорганизмов, вторая – контрольная. Сразу после внесения бактериальной культуры и через 24 ч инкубирования при 28 ± 2 °С измеряли pH полученной суспензии. Эффективность штаммов молочнокислых бактерий оценивали по разнице активной кислотности между опытом и контролем [6].

Результаты и их обсуждение. Силосование – это биологический способ консервирования кормов растительного происхождения, в основе которого лежит процесс молочнокислого брожения. Получаемый в результате высококачественный корм пригоден для длительного хранения без значительных потерь питательных веществ и снижения качества. Обогащение растительной массы специально подобранными культурами

молочнокислых бактерий создает в силосе благоприятную для его хранения активную кислотность, вызывает быстрое накопление молочной кислоты и обеспечивает низкое содержание летучих кислот.

Анализ литературных данных свидетельствует, что в последние годы для силосования кормов в качестве консервантов все активнее применяют сухие биоконсерванты [1–3]. Микроорганизмы, используемые в биоконсервантах, относятся к разным видам молочнокислых бактерий, но в основном – к лактобациллам.

Одной из особенностей лактобацилл является наличие антагонистической активности к маслянокислым, спорообразующим бактериям и бактериям группы кишечной палочки (БГКП).

Известно, что из общего количества эпифитной микрофлоры на зеленых кормах молочнокислые бактерии составляют только 0,5–0,7%, а подавляющее большинство микроорганизмов представлено технически вредной флорой, в первую очередь клостридиями и бактериями *E. coli*. При разработке консорциума молочнокислых микроорганизмов для нового биоконсерванта «Биоплант» особое внимание уделено штаммам, обладающим высокой степенью ингибирования роста возбудителей маслянокислого брожения, поскольку споры из силоса вместе с частицами корма зачастую попадают в молоко. При производстве ферментированных молочных продуктов, в частности сыров, некоторые виды маслянокислых бактерий (*Clostridium tyrobutyricum*) при определенных условиях могут размножаться до конца созревания, вызывая пороки вкуса, рисунка, консистенции, цвета и внешнего вида. Спорами маслянокислых бактерий может быть загрязнен любой ферментированный корм. Размножение в силосе маслянокислых бактерий сопровождается снижением его кормовой ценности: если при сбраживании углеводов молочнокислыми бактериями потери энергии составляют 4%, то при *Clostridium tyrobutyricum* они повышаются до 24%.

При изучении антагонистической активности лактобацилл к бактериям *Clostridium tyrobutyricum* (табл. 2) установлено, что наибольшим уровнем антагонистической активности в отношении клостридий обладали штаммы 1186 LA–AVF, a12, pl 5, 2593 ML–AF, 1964 ML–F, 1157 ML–AF, pl 30/2, 1180 ML–OF, cas3, cas4/2, 1188ML–OF, 1189 ML, при этом зона задержки роста маслянокислых микроорганизмов составила 6–7 мм, а, размер зоны задержки роста бактерий *E. coli* варьировал от

3 мм (для штамма 2389 TL-AV, обладающего наименьшей антагонистической активностью) до 16 мм (для штаммов pl 3, 1157 ML-AF, 2593 ML-AF, обладающих максимальной антагонистической активностью в отношении БГКП). Следует отметить, что 49,7% штаммов исследованных лактобацилл проявляли высокий уровень антагонизма в отношении БГКП.

Таблица 2 – Изучение антагонистической активности бактерий р. *Lactobacillus*

Культура	Штамм	Размер зоны задержки роста, мм	
		<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	364 LA-AVF	5	7
	1186 LA-AVF	6	9
	a1	5	5
	a4	4	6
	a9	4	5
	a11	4	8
	a12	6	8
	a16	5	6
	a14	2	6
<i>Lactobacillus helveticus</i>	2389 TL-AV	2	3
<i>Lactobacillus plantarum</i>	pl 1	3	12
	pl 2	4	10
	pl 3	4	16
	pl 4	5	9
	pl 5	6	15
	pl 6	3	9
	pl 7	5	9
	pl 8	3	8
	pl 10	5	10
	pl 12	3	10
	pl 14	5	6
	pl 15	3	10
	pl 16	3	6
	pl 21	5	9
	pl 22	7	15
	1190 ML-AF	5	15
	2593 ML-AF	7	16
	pl 27	5	4
	1964 ML-F	7	6
	1157 ML-AF	7	16
	pl 30/2	7	6
	pl 9	5	7
	1180 ML-OF	6	15
<i>Lactobacillus casei</i>	cas3	6	8
	cas4/1	5	6
	cas4/2	6	10
	1188ML-OF	7	9
	1189 ML	6	8
	cas6	5	7

Еще одной особенностью лактобацилл является их устойчивость к высокому содержанию солей [7]. Особой популярностью пользуются препараты, созданные на основе гомоферментативных осмоотолерантных штаммов молочнокислых бактерий, способных активно размножаться и функционировать при повышенной водоудерживающей силе растительных клеток. К настоящему времени их высокая эффективность доказана как научными исследованиями, так и производственными испытаниями [8–12]. При силосовании трав с высоким содержанием сухого вещества (30–45%) молочнокислое брожение протекает слабо из-за дефицита осмоотолерантных штаммов молочнокислых бактерий в составе эпифитной микрофлоры. Поэтому эффект от использования биологических консервантов, содержащих осмоотолерантные штаммы молочнокислых бактерий, за счет сокращения в 1,5–2,0 раза потерь питательных веществ и повышения на 15–20% энергетической питательности сухого вещества существенно увеличивается.

При изучении осмоотолерантности лактобацилл установлено, что при культивировании штаммов лактобацилл с добавлением 10%-ного раствора KCl разница активной кислотности за 24 ч культивирования варьировала от 1,03 (для штамма р1 15) до 2,25 (для штамма 2593 ML-AF). При этом 54% штаммов обладали средним уровнем осмоотолерантности (изменение рН составило от 1,50 до 1,79) и 33% высоким уровнем осмоотолерантности (изменение рН – более 1,80) (табл. 3) [13, 14].

Известно, что размножение маслянокислых микроорганизмов прекращается при снижении активной кислотности в силосе до 4,2 и ниже. Как видно из табл. 3, все исследуемые нами штаммы способны активно развиваться в среде с указанной кислотностью.

Таким образом, для дальнейшего изучения с целью составления консорциумов для использования в составе биоконсерванта «Биоплант» были выбраны штаммы *Lactobacillus acidophilus* (a12, 1186 LA-AVF), *Lactobacillus plantarum* (2593 ML-AF, 1157 ML-AF, 1180 ML-OF) и *Lactobacillus casei* (cas3, 1188 ML-OF), которые обладали высоким уровнем антагонистической активности по отношению к технически вредной микрофлоре, а также максимальной осмоотолерантностью среди микроорганизмов своего вида (табл. 2, 3).

Таблица 3 – Изучение осмотолерантности бактерий р. *Lactobacillus*

Культура	Штамм	Изменение pH среды при культивировании с 10%-ного раствора KCl	Рост в среде с pH		
			4,2	4,0	3,8
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	364 LA–AVF	1,75	+	+	+
	1186 LA–AVF	1,91	+	+	+
	a1	1,50	+	+	+
	a4	1,52	+	+	+
	a9	1,51	+	+	+
	a11	1,63	+	+	+
	a12	1,97	+	+	+
	a16	1,80	+	+	+
	a14	1,41	+	+	+
<i>Lactobacillus helveticus</i>	2389 TL–AV	1,84	+	+	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	pl 1	1,81	+	+	+
	pl 2	1,67	+	+	+
	pl 3	1,79	+	+	+
	pl 4	1,69	+	+	+
	pl 5	1,76	+	+	+
	pl 6	1,71	+	+	+
	pl 7	1,67	+	+	+
	pl 8	1,90	+	+	+
	pl 10	1,77	+	+	+
	pl 12	1,74	+	+	+
	pl 14	1,7	+	+	+
	pl 15	1,03	+	+	+
	pl 16	1,69	+	+	+
	pl 21	1,63	+	+	+
	pl 22	1,31	+	+	+
	1190 ML–AF	1,84	+	+	+
	2593 ML–AF	2,25	+	+	+
	pl 27	1,55	+	+	+
	1964 ML–F	1,05	+	+	+
	1157 ML–AF	2,20	+	+	+
pl 30/2	1,07	+	+	+	
pl 9	1,68	+	+	+	
1180 ML–OF	2,24	+	+	+	
<i>Lactobacillus casei</i>	cas3	1,61	+	+	+
	cas4/1	1,82	+	+	+
	cas4/2	1,90	+	+	+
	1188ML–OF	1,93	+	+	+
	1189 ML	1,77	+	+	+
	cas6	1,55	+	+	+

В ходе выполнения работы разработаны критерии отбора микроорганизмов для создания с их использованием консорциумов для биологического консерванта для силосования. Штаммы должны:

- обладать выраженной антагонистической активностью к условно-патогенной и технически вредной микрофлоре;
- являться осмоотолерантными (способными активно размножаться при повышенной водоудерживающей силе растительных клеток);
- стимулировать естественный процесс молочного брожения с образованием молочной кислоты, снижая рН силоса до 4,2–4,0.

Заключение. В результате проведенных исследований разработаны критерии отбора микроорганизмов в состав биоконсерванта. Выбраны штаммы, перспективные для силосования растительной массы, для использования в составе биоконсерванта «Биоплант»: *Lactobacillus acidophilus* (a12, 1186 LA-AVF), *Lactobacillus plantarum* (2593 ML-AF, 1157 ML-AF, 1180 ML-OF) и *Lactobacillus casei* (cas3, 1188 ML-OF), обладающие высоким уровнем антагонистической активности по отношению к технически вредной микрофлоре, максимальной осмоотолерантностью среди микроорганизмов своего вида и удовлетворяющие разработанным критериям отбора.

Литература

1. Попков, Н.А. Корма и биологически активные вещества / Н.А. Попков, Н.А. Фисинин [и др.]. – Минск, 2005. – с. 8.
2. McDonald, P. The biochemistry of silage / P. McDonald. – Toronto, 1985. – с. 18–45.
3. Романюк, Г. Консерванты при силосовании кормов / Г. Романюк // «Белорусская нива». – 2008. – 10 окт. – С. 5.
4. De Man, J.C. A medium for the cultivation of lactobacilli / J.C. De Man, M. Rogosa, M.E. Sharpe J. // Appl. Bacteriol. – 1960. – Vol. 23. – P. 130–135.
5. Гудков, А.В. Взаимодействие молочнокислых палочек и маслянокислых бактерий, вызывающих порчу сыра / А.В. Гудков, К.П. Алексеева // Молочная промышленность. – 1970. – № 1. – С. 25.
6. Способ определения эффективности препаратов молочнокислых бактерий при силосовании провяленных трав: пат. № 2173060 Респ. Беларусь, RU, С2 А23 К3/02. / Победнов, Ф. Вайсбах; заявитель Победнов Ю.А. заявл. 01.12.1998; опубл. 10.09.2001г. – С. 4.
7. Hammes, W. P. The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. / W.P. Hammes, N. Weiss, W. Holzapfel // The Prokaryotes. / A. Balows,

H.G. Troper, M. Dworkin, W. Harder, K.-H. Schleifer (Eds.), – New York, 1992. – P. 1535–1594.

8. Jones, B.A. Influence of bacterial inoculant and substrate addition to lucerne ensiled at different dry matter contents / B.A. Jones, L.D. Satter, R.E. Muck // *Grass Forage Sci.* – 1992. – Vol. 47. – P. 19–27.

9. Kung, L. The effect of *Lactobacillus buchneri* and other additives on the fermentation and aerobic stability of barley silage / L. Kung, N.K. Ranjit // *J. Dairy Sci.* – 2001. – Vol. 84. – P. 1149–1155.

10. Банникова, Н.А. Микробиологические основы молочного производства / Н.А. Банникова, Н.С. Королева, В.Ф. Семенихина // М. – 1987. С. 148–157.

11. Фурик, Н.Н. Определение оптимальных условий культивирования *Lactobacillus helveticus* / Н.Н. Фурик, Е.В. Калиновская // Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии: материалы междунар. науч. конф. ГНУ «Институт микробиологии», Минск, 2008. – С. 45–48.

12. Егоров, Н.С. Взаимоотношения микроорганизмов в естественных условиях / Егоров Н.С. – М.. 1978. – С. 322.

13. Петрушеня, Н.И. Критерии отбора молочнокислых бактерий для нового биоконсерванта «Биоплант» / Н.И. Петрушеня // Инновационные технологии в производстве пищевых продуктов: сб. тр. VII Междунар. науч.-практ. конф. – Минск, 2008. – С.133–135.

14. Петрушеня, Н.И. Подбор оптимального консорциума молочнокислых бактерий для создания нового биологического консерванта / Н.И. Петрушеня // Техника и технология пищевых производств: сб. тр., VI Междунар. науч. конф. студентов и аспирантов, – Могилев, 2008. – С. 124–125.

S. Vasylenko, N. Petrushenia, N. Furik

**APPLICATION OF PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL
FEATURES OF *LACTOBACILLUS*
FOR BIOCONSERVANT CREATING**

Summery

Analysis of physiological and biochemical features of *Lactobacillus* allowed to develop the criterions of microorganism choice for biological conserving agent creating. *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei* were selected on developing criterions and used in bioconservant «Bioplant».