

УДК 576.8.094:631.461.1:636.085.52

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ АНАЭРОБОВ РОДА CLOSTRIDIUM, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ СИЛОСОВ

В. Т. ЕМЦЕВ, Г. И. ПЕРЕВЕРЗЕВА, Е. А. АЛЕШИНА

(Кафедра микробиологии)

Одним из путей улучшения качества силоса, в частности повышения его белковости, является использование при силосовании бобовых культур, например клевера, широко распространенного в Нечерноземной зоне. Силосование клевера экономически более выгодно, чем заготовка на сено [1]. Однако клевер считается трудносилосуемой культурой вследствие недостаточного содержания растворимых углеводов, необходимых для успешного развития молочно-кислого брожения в силосуемой массе. Из-за этого в ней может развиваться нежелательная микрофлора, особенно споровые анаэробы рода *Clostridium* [10, 24 и др.]. Накопление метаболитов клостридий вызывает ухудшение органолептических свойств и потребления корма животными. Особенно важно качество силоса в зонах сыростояния, так как споры клостридий из молока попадают в сыры, где могут развиваться и способствовать их порче [6].

В литературе нет сведений о биологических особенностях протеолитических клостридий, развивающихся в силосе, в то время как масляно-кислые (лактатферментирующие) бактерии силосов изучены достаточно полно [10, 15, 18—20]. Не исследована роль клостридий в силосах из бобовых при значениях рН выше 4,2, когда возможно сосуществование и взаимодействие их с другими представителями силосной микрофлоры.

В связи с изложенным нами были поставлены следующие задачи:

— изучить численность протеолитических и других анаэробов рода *Clostridium* в силосах в динамике;

— выделить культуры протеолитических анаэробов из силосов на разных этапах силосования, идентифицировать и изучить их морфологические, культуральные и физиологические особенности;

— исследовать влияние некоторых физико-химических и биологических факторов, важных для силосования, на физиологические свойства протеолитических клостридий;

— изучить роль протеолитических клостридий в изменении биохимического состава клеверной массы в процессе силосования в обычных и гнотобиотических условиях.

Объекты и методы

Исследовали силосы, полученные в производственных и лабораторных условиях. Производственные силосы из клевера, разнотравья, горохоовсяной и клеверотимофеечной смеси были заложены в буртах и траншеях. Пробы силосов в возрасте 15—90 сут отбирали силосным буром. Лабораторные силосы получены из измельченной массы клевера и кукурузы, инкубированной в герметичных стеклянных бутылках при 28°. Был проведен один опыт по силосованию кукурузы и два — по силосованию клевера с молочно-кислой закваской и без нее [5]. Анализы исходной массы и силоса проводили на 1, 3, 5, 7, 15, 30 и 45-е сутки.

Гнотобиотические силосы готовили из клеверной массы, облученной гамма-лучами и дробно-текучим паром. Варианты внесения культур микроорганизмов следующие: 1 — молочнокислые бактерии, 2 — молочнокислые + протеолитические клостридии, 3 — протеолитические клостридии, 4 — молочнокислые + гнилостные бактерии + протеолитические клостридии, 5 — гнилостные аэробы + протеолитические клостридии. Дозы внесения молочнокислых бактерий 10^6 , гнилостных — 10^5 , протеолитических клостридий — 10^8 клеток на 1 г. Исходную массу и силос анализировали на 7-е и 45-е сутки. Повторность 5-кратная.

Влажность, общую и активную кислотность, сахарный минимум определяли общепринятыми методами; содержание редуцирующих сахаров — по Бертрану, летучих кислот и спиртов — методами ГЖХ. Буферность массы устанавливали по [24], общий и белковый азот — по Кьельдалю, аммиачный — нингидриновым методом [7], аммиачный — по Конвею. Аминокислотный анализ проводили с помощью анализатора 835-50 (Hitachi, Япония). Данные ряда опытов обрабатывали методами вариационной статистики.

Учет численности спорных анаэробов и их спор проводили методом предельных разведений в жидких питательных средах. На основании сравнительного изучения сред для учета численности протеолитических анаэробов была выбрана селективная среда ССПА с антибиотиками неомидином и полимиксином [3], для учета лактатферментирующих клостридий — лактатно-ацетатная среда ЛАСА [6], для ацетонобутиловых анаэробов — 5 %-ный кукурузный затор, для определения общего количества сахаролитических анаэробов — пептонно-дрожжевая среда для *S. pasteurianum* [13]. Все среды для анаэробов содержали 0,05 % солянокислого цистенна и 0,004 % нейтральрота. Общую численность аэробов определяли на сусло-агаре, молочнокислых бактерий — на сусло-агаре с мелом и спиртом, гнилостных бактерий — на пептонном агаре, кишечной палочки — на среде Кесслера. Численность всех видов бактерий пересчитывали на 1 г сухого вещества силосов. Антибиотические свойства силосного сока по отношению к *S. butylicum*, *S. sporogenes* и *Ps. herbicola* изучали методами разведений и перпендикулярных штрихов [7].

Выделение культур проводили по схеме [26] на средах ССПА, ЛАСА, кукурузном

заторе с отбором изолированных колоний при 10—12-кратном пересеве. Выделенные культуры идентифицировали по Бергу [28].

Морфологические особенности изучали с помощью микроскопа МБИ-1 и электронного микроскопа JEM-7 (Япония). Культуральные и физиологические особенности выделенных *Clostridium* исследовали в 8 видах питательных сред [28]. Протеолитическую активность культур выражали в протеолитических единицах (п. е.) по методу Ансона [2]. Трансформацию белков молока клостридиями оценивали методом Климовского [11]. Развитие культур при 20, 28, 37 и 43°, а также при pH 4,7; 5,0; 5,3; 5,5; 6,0 и 7,0 изучали методом нефелометрии. Влияние кислорода и перекиси водорода на рост клостридий определяли с помощью полярографа LP-60 (ЧССР), накопление летучих кислот и спиртов у *Clostridium* при разных температурах, pH и активности воды в среде устанавливали методами ГЖХ. При исследовании реакции Стикланда у анаэробов определяли летучие кислоты газохроматографически, аммиак — методом Конвея.

Влияние молочнокислых и гнилостных бактерий на рост, протеолитическую активность и продукты брожения у выделенных клостридий изучали при совместном культивировании их в специальных сосудах с полупроницаемой мембраной в молоке в среде СДА с буфером.

Результаты

Распространение *Clostridium* в силосах, приготовленных в производственных и лабораторных условиях. По литературным данным, клостридии встречаются во всех силосах, получаемых в производственных условиях, в количестве от 10^3 до 10^8 клеток на 1 г [9, 29 и др.]. Отмечалось преобладание в силосах либо масляно-кислых, либо протеолитических анаэробов [20]. Присутствие спор анаэробов (до 10^7 на 1 г) является показателем пониженного качества корма [23].

В наших опытах все пробы производственных силосов содержали анаэробы и их споры, несмотря на низкий уровень pH (табл. 1). При этом протеолитические анаэробы доминировали над лактатферментирующими в 4 силосах из 5. В 3-месячном силосе численность анаэробов была выше, чем в молодых силосах, а количество спор, на-

Т а б л и ц а 1

Численность анаэробной микрофлоры силосов, приготовленных в производственных условиях

Сырье	Возраст, сут	pH	Количество клеток в 1 г сухого вещества		
			протеолитических	лактатферментирующих	общее
Горох + овес	15	4,23	$6 \cdot 10^3$	$6 \cdot 10^4$	$4 \cdot 10^5$
Разнотравье	45	3,96	$9 \cdot 10^3$	0	$2 \cdot 10^4$
Клевер	45	3,97	$2 \cdot 10^3$	0	$4 \cdot 10^3$
Тимофеевка	60	4,05	$7 \cdot 10^3$	0	$4 \cdot 10^3$
Клевер + тимофеевка	90	3,94	$5 \cdot 10^5$	0	$2 \cdot 10^3$

Численность анаэробных и аэробных бактерий (на 1 г сухого вещества)
в лабораторных силосах на разных этапах силосования (в скобках — количество спор)

Возраст, сут	рН	Анаэробы				Аэробы	
		протеолитические	ацетоно-бутиловые	сахаролитические	лактат-ферментирующие	гнилостные	молочно-кислые
Силос из клевера							
0	5,95	0	0	0	0	$6,6 \cdot 10^7$	$2,0 \cdot 10^6$
1	5,15	$6,2 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^7$	$2,8 \cdot 10^4$	0	$1,0 \cdot 10^8$	$7,9 \cdot 10^9$
5	5,03	0	$6,6 \cdot 10^6$	0	0	$9,1 \cdot 10^4$	$1,1 \cdot 10^9$
7	5,25	$3,0 \cdot 10^6$	$3,0 \cdot 10^7$ ($2,9 \cdot 10^3$)	0	0	$1,0 \cdot 10^7$	$8,5 \cdot 10^8$
15	5,56	$3,1 \cdot 10^4$ ($1,3 \cdot 10^3$)	$3,1 \cdot 10^4$ ($3,1 \cdot 10^3$)	0	$1,3 \cdot 10^2$	$7,7 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^8$
30	5,50	$2,8 \cdot 10^3$	$6,2 \cdot 10^2$	0	0	$1,4 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^8$
45	5,68	$1,5 \cdot 10^5$ ($1,5 \cdot 10^3$)	$1,5 \cdot 10^5$	0	$1,5 \cdot 10^2$	$2,0 \cdot 10^6$	$5,7 \cdot 10^7$
Силос из кукурузы							
0	6,45	$2,8 \cdot 10^1$	$2,8 \cdot 10^2$	0	0	$5,4 \cdot 10^7$	$1,8 \cdot 10^4$
1	5,18	$5,8 \cdot 10^4$	$1,1 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^4$	0	$4,8 \cdot 10^7$	$2,6 \cdot 10^8$
3	4,20	$6,0 \cdot 10^1$	$2,1 \cdot 10^2$	0	0	$1,5 \cdot 10^5$	$1,6 \cdot 10^9$
7	4,48	0	$2,2 \cdot 10^4$	0	0	$8,5 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^9$
15	5,15	0	$2,4 \cdot 10^3$	0	0	$3,7 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^9$
30	4,82	$1,2 \cdot 10^2$	$5,5 \cdot 10^2$ ($2,3 \cdot 10^2$)	$1,2 \cdot 10^2$	0	$2,5 \cdot 10^4$	$1,0 \cdot 10^9$
45	4,23	0	$2,8 \cdot 10^2$	0	0	$3,4 \cdot 10^2$	$1,9 \cdot 10^5$

оборот, ниже, вероятно, вследствие их прорастания.

Результаты микробиологического анализа лабораторных силосов отражают ход процессов в начале силосования (табл. 2). Начальное количество анаэробов в клеверной массе не влияло на ход их дальнейшего развития в силосе. Протеолитические и ацетонобутиловые анаэробы преобладали над масляно-кислыми (лактатферментирующими). Численность их несколько снижалась к середине опыта, но вновь возрастала к 45-м суткам. Споры анаэробов появлялись на 5—7-е сутки. В кукурузной массе молочно-кислое брожение развивалось быстрее, а анаэробы были относительно подавлены. Таким образом, в клеверной силосуемой массе существуют более благоприятные условия для раз-

вития споровых анаэробов, чем в кукурузной. В клеверной массе высока также численность гнилостных аэробных микроорганизмов.

Внесение молочно-кислой закваски в клеверный силос активизировало молочно-кислое брожение и способствовало подавлению споровых анаэробов в начале силосования, но они вновь появлялись на 7—15-е сутки при рН 4,74—4,50 и спорулировали (табл. 3). Таким образом, молочно-кислая закваска не обеспечивала стабильности клеверного силоса, но повышала классность корма (с неклассного до 3-го класса).

Изучение антибиотических свойств силосного сока методом разведения показало, что при спонтанном силосовании отсутствовала антибиотическая активность против тест-

Таблица 3

Численность анаэробных и аэробных бактерий (на 1 г сухого вещества)
в лабораторном силосе из клевера при внесении молочно-кислой закваски
(в скобках — количество спор)

Возраст, сут	рН	Анаэробы			Аэробы	
		протеолитические	ацетоно-бутиловые	кишечная палочка	гнилостные	молочно-кислые
0	6,32	$4,5 \cdot 10^3$	$2,0 \cdot 10^5$	$2,1 \cdot 10^3$	$5,5 \cdot 10^3$	$4,3 \cdot 10^8$
1	5,65	$7,7 \cdot 10^6$	$2,1 \cdot 10^6$	$1,9 \cdot 10^5$	$7,0 \cdot 10^7$	$4,7 \cdot 10^8$
5	5,18	0	$1,1 \cdot 10^4$ ($1,1 \cdot 10^3$)	$2,2 \cdot 10^4$	$1,7 \cdot 10^8$	$5,8 \cdot 10^8$
7	4,85	0	0	$8,8 \cdot 10^5$	$2,2 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^8$
15	4,75	0	$2,5 \cdot 10^4$	0	$2,6 \cdot 10^6$	$8,0 \cdot 10^8$
30	4,80	$1,0 \cdot 10^2$	$2,9 \cdot 10^2$ ($1,2 \cdot 10^2$)	0	$4,8 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^7$
45	4,65	$2,8 \cdot 10^1$	$6,0 \cdot 10^4$ ($3,0 \cdot 10^4$)	0	$3,9 \cdot 10^6$	$6,9 \cdot 10^6$

Антибиотическая активность сока силоса с молочно-кислой закваской

Возраст силоса, сут	Тесткультура	Разведение					
		1:2		1:4		1:8	
		сок	контроль	сок	контроль	сок	контроль
1	<i>C. butyricum</i>	—	+	+	+	+	+
	<i>C. sporogenes</i>	—	+	+	+	+	+
	<i>Ps. herbicola</i>	—	+	+	+	+	+
3	<i>C. butyricum</i>	—	+	—	+	+	+
	<i>C. sporogenes</i>	—	+	+	+	+	+
	<i>Ps. herbicola</i>	—	+	+	+	+	+
5	<i>C. butyricum</i>	—	+	+	+	+	+
	<i>C. sporogenes</i>	—	+	+	+	+	+
	<i>Ps. herbicola</i>	—	+	+	+	+	+
7	<i>C. butyricum</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>C. sporogenes</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>Ps. herbicola</i>	+	+	+	+	+	+

культур *C. butyricum*, *C. sporogenes*, *Ps. herbicola*. При внесении закваски в 1-ю неделю силосования вывлена слабая (в 1—2-м разведениях) антибиотическая активность главным образом против *C. butyricum*. После 7 сут она исчезала, что, очевидно, связано с затуханием молочно-кислого брожения (табл. 4).

Специфическое ингибирование тесткультуры *C. sporogenes*, которое мы изучали методом перпендикулярных штрихов, было статистически недостоверным ($P=0,95$). Следовательно, молочно-кислая закваска оказывает угнетающее действие на развитие анаэробов в силосе в основном за счет подкисления массы.

Данные, полученные на этом этапе исследований, свидетельствуют о способности протеолитических и ацетонобутиловых анаэробов развиваться в клеверной массе при рН менее 5,0. Это послужило дополнительным основанием для углубленного изучения данных бактерий, в связи с чем проведена работа по получению культур анаэробов из силосов.

Морфологические, культуральные и физиологические свойства *Clostridium*, выделенных из силосов. Из производственных силосов было получено 20 накопительных культур протеолитических и 2 — лактатферментирующих, из лабораторных — 44 накопительные культуры протеолитических анаэробов. После их очистки получено 6 культур протеолитических анаэробов из производственных силосов и 6 — из лабораторных (в динамике). Лактатферментирующие анаэробы отличались слабым ростом и были утрачены.

Полученные культуры отнесены к следующим видам рода *Clostridium*: *C. sporogenes* — 10 штаммов, *C. acetobutylicum* — 1 штамм и *C. subterminale* — 1 штамм. Последний из силоса выделен впервые. Из кукурузного силоса в начале ферментации выделен *C. sporogenes*, в конце — *C. acetobutylicum*, а в клеверном силосе развивались штаммы *C. sporogenes*.

Морфологические, культуральные свойства и динамика развития выделенных культур соответствовали описанным в литературе для почвенных и патогенных видов [28 и др.]. Представляет интерес тот факт, что

полученный нами штамм *C. acetobutylicum* не давал реакции на гранулезу. С помощью электронной микроскопии установлено наличие перистых выростов на спорах *C. sporogenes* 502.

Изучение физиологических особенностей выделенных клостридий показало, что общими свойствами у них являются необратимое разжижение желатины, пептонизация белков молока, отсутствие каталазы, пектиназы, выделение аммиака, сероводорода, непатогенность для белых мышей. Половина штаммов вызывала гемолиз на кровяном агаре; липолитическую активность проявляли все культуры, кроме *C. acetobutylicum*. Штамм *C. sporogenes* 621 обладал способностью к редукции нитрата. Протеолитическая активность культур составляла 23,9—38,2 п. ед. при рН 7,0, что соответствует активности почвенных клостридий [2]. Развитие клостридий в молоке сопровождалось убылью белковых веществ на 98,2%, приростом содержания пептидов до 17 раз, свободных аминокислот в культуральной жидкости — в 2,5—5,6 раза. Силосные протеолитические клостридии способны к ассимиляции большего набора углеводов, чем выделенные из почвы и пищевых продуктов. Из 12 полученных штаммов 8 были способны к сбраживанию мальтозы (сахара, характерного для зеленой массы клевера [10]), что может быть проявлением отбора в силосе штаммов, приспособленных к данным экологическим условиям. Изучавшиеся клостридии способны к росту в присутствии кислорода в среде в концентрации 7,55—7,64 мг/л, тогда как масляно-кислые бактерии испытывают угнетение при 5,5—5,6 мг/л [16].

Таким образом, протеолитические клостридии, выделенные из силосов, сочетают высокую протеолитическую активность со способностью к усвоению углеводов, что наряду с относительной устойчивостью к присутствию кислорода в среде обеспечивает им преимущество при развитии в силосовой массе.

Влияние некоторых физико-химических и биологических факторов, важных для силосования, на физиологические свойства *Clostridium*. Ход микробиологических и биохимических процессов

Количество и состав летучих кислот у *C. sporogenes* в зависимости от pH

Показатель	pH 7,0			pH 6,0			pH 5,7		
	штаммы								
	502	602	707	502	602	707	502	602	707
Сумма кислот:									
мг%	57,42	40,55	57,56	45,69	16,11	21,19	14,42	4,0	0,96
% от максимума	100,0	100,0	100,0	79,6	39,7	36,8	25,1	9,9	1,7
Соотношение кислот, %:									
формиат	42,6	31,0	27,3	37,6	17,1	18,5	14,5	17,0	42,7
ацетат	23,6	61,2	60,0	49,0	66,9	62,3	82,5	78,8	57,3
пропионат	23,1	0,0	6,6	6,5	7,2	3,4	0,9	1,2	0,0
бутират	10,7	7,8	6,1	6,9	8,8	11,8	2,9	3,0	0,0

при силосовании существенно зависит от таких условий, как активная кислотность среды, влажность массы, характеризуемая активностью воды (A_w), и температура.

Успех силосования определяется скоростью развития молочно-кислого брожения и подкисления силосуемой массы до pH 4,2. Есть сведения о том, что протеолитические анаэробы в силосе подавлены при pH менее 5,7 [7]. В наших исследованиях клостридии, выделенные из силосов, были способны начать рост в забуференной среде при начальном значении pH 5,3. При снижении pH среды с глюкозой с 7 до 5,7 общее количество летучих кислот-метаболитов у клостридий снижалось, в их составе возрастало относительное содержание ацетата и продолжалось образование небольших количеств бутирата (табл. 5).

Протеолитическая активность *C. sporogenes* и *C. subterminale* при pH 5,7 снижалась на 3,4—14,2%, а у *C. acetobutylicum* повышалась на 5%. Продуктами реакции Стикланда при pH 7,0 у *C. sporogenes*, кроме аммиака, был ацетат, у *C. subterminale* — ацетат и формиат, у *C. acetobutylicum* — ацетат и пропионат. При pH 5,7 ход реакции Стикланда также изменялся в сторону преимущественного синтеза ацетата.

Такая же тенденция отмечена у *Clostridium* при брожении глюкозы в среде с понижающейся активностью воды (табл. 6).

Максимум накопления кислот у изучавшихся клостридий отмечен при A_w 0,970 (в опытах [18] — A_w 0,995). При предельном значении A_w 0,955 наблюдался рост *C. sporogenes* 502. Следовательно, активность воды силосуемой массы должна быть менее 0,955.

Протеолитические клостридии, выделенные из силосов, относятся к мезофильным микроорганизмам. Максимум накопления летучих кислот у них наблюдался при 30°. Количество и состав кислот-метаболитов глюкозы при снижении температуры до 20° и повышении до 40° значительно варьировали у разных штаммов. По-видимому, в силосе клостридии могут образовывать кислоты в широком интервале температур.

Другими продуктами разложения глюкозы у протеолитических клостридий являются спирты, в основном этанол. В кислой среде их образовывалось на 0,2—10,0% меньше.

Таким образом, лимитирующими физико-химическими факторами для протеолитических клостридий в силосе могут быть уровень pH и A_w .

Представляло интерес рассмотреть влияние на рост и метаболизм *Clostridium* молочно-кислых и гнилостных бактерий — представителей силосной микрофлоры.

В литературе есть сведения о том, что молочно-кислые бактерии являются ингибито-

Таблица 6

Количество и состав летучих кислот у *C. sporogenes* в зависимости от активности воды

Показатель	$A_w = 0,995$		$A_w 0,970$		$A_w 0,960$		$A_w 0,955$	
	штаммы							
	502	602	502	602	502	602	502	602
Общее количество кислот:								
мг%	52,81	54,41	60,22	63,30	23,21	35,55	2,61	0,0
% от максимума	86,2	85,9	100,0	100,0	38,5	56,3	4,3	0,0
Соотношение кислот, %:								
формиат	3,7	2,5	2,0	1,5	4,7	7,5	11,4	0,0
ацетат	82,3	79,8	89,8	84,3	89,1	83,7	44,4	0,0
пропионат	4,5	4,2	2,2	4,1	3,8	4,8	0,0	0,0
бутират	9,5	13,5	6,0	10,1	2,4	4,0	43,7	0,0

Интенсивность роста и продукты брожения глюкозы при совместном культивировании *Clostridium*, молочно-кислых и гнилостных бактерий

Виды и штаммы	рН	Биомасса, ед. оптической плотности	КС*	Содержание летучих кислот				
				общее, мг %	в т. ч., %			
					формат	ацетат	пропионат	бутират
Монокультуры:								
<i>L. plantarum</i>	5,10	0,79	—	29,05	22,8	67,6	3,6	6,0
<i>E. coli</i>	5,80	0,80	—	72,88	11,6	88,4	0,0	0,0
<i>Ps. herbicola</i>	6,08	0,98	—	219,78	23,2	67,4	8,1	1,3
<i>B. mycoides</i>	5,50	0,28	—	13,08	52,9	40,4	1,3	5,4
<i>C. sporogenes</i>	6,40	0,58	—	56,84	2,7	87,3	8,9	1,1
Совместные культуры:								
<i>C. sporogenes</i> + <i>L. plantarum</i>	4,80	0,86	1,48	20,81	2,3	92,3	0,0	5,4
<i>C. sporogenes</i> + <i>E. coli</i>	6,05	0,84	1,45	47,67	9,8	68,5	6,2	15,5
<i>C. sporogenes</i> + <i>L. plantarum</i> + <i>E. coli</i>	5,10	0,87	1,50	370,47	3,5	81,6	1,3	15,5
<i>C. sporogenes</i> + <i>Ps. herbicola</i> + <i>L. plantarum</i>	5,75	0,58	1,00	122,68	2,5	84,0	1,4	12,1
<i>C. sporogenes</i> + <i>B. mycoides</i>	6,35	0,62	1,07	25,09	10,3	70,9	11,7	7,7
<i>C. sporogenes</i> + <i>B. mycoides</i> + <i>L. plantarum</i>	5,75	0,57	0,98	114,03	1,9	81,5	1,3	15,3

* Коэффициент стимулирования, равный частному от деления оптической плотности опытной культуры на аналогичный показатель в контроле.

рами спорных анаэробов [4]. Гнилостные аэробные микроорганизмы известны как комменсалы *Clostridium* [18]. Принимая во внимание факт длительного развития и существования в силосах из бобовых спорных анаэробов, гнилостных и молочно-кислых бактерий, мы провели серию опытов по совместному культивированию указанных бактерий в жидкой питательной среде с глюкозой.

При совместном культивировании клостридий с молочно-кислыми палочками в среде с буфером (мел) *Clostridium* развивались при падении рН до 5,8 и накоплении перекиси водорода до 15,3 мг/л. При этом *C. sporogenes* не подавлялся при 1000-кратном численном превосходстве *L. plantarum*. Распад азотистых веществ в совместных культурах *Clostridium* и *L. plantarum* был в 1,1—3,2 раза сильнее, чем в монокультурах. Накопление биомассы у *C. sporogenes* повышалось в присутствии *L. plantarum* (табл. 7).

Характер взаимоотношений клостридий с молочно-кислыми и гнилостными бактериями в буферной среде в значительной степени зависел от их вида и штамма. У *C. sporogenes* 502 и *C. acetobutylicum* возрастало накопление биомассы в присутствии *L. plantarum*, *Ps. herbicola* и *E. coli*. В то же время *Ps. herbicola* и *B. mycoides* угнетали рост *C. sporogenes* 707. В присутствии молочно-кислых бактерий и *B. mycoides* в составе метаболитов у клостридий возрастало содержание ацетата, в присутствии *Ps. herbicola* — формата, *E. coli* — бутирата. Аналогично усиливался синтез бутирата у масляно-кислых бактерий в присутствии гнилостных [18].

В опытах по совместному культивированию *Clostridium*, *E. coli* и *L. plantarum* суммарное количество кислот-метаболитов возрастало, в варианте с *C. acetobutylicum* — снижалось, но везде повышалось относительное содержание ацетата. Отмечалось увеличение содержания бутирата в культуральной жидкости при совместном культивировании клостридий, молочно-кислых бактерий и *B. mycoides* или *Ps. herbicola*.

Таким образом, установлено, что образование летучих кислот у протеолитических клостридий, выделенных из силоса, усиливается в присутствии гнилостных аэробов. Ацетат в силосе является частью буферной системы [10]. В буферной среде, какой является силос из бобовых, молочно-кислые бактерии могут стимулировать развитие клостридий, в результате чего процессы брожения приобретают характер гнилостных. Вследствие видовой и штаммовой вариабельности протеолитические клостридии в силосе образуют из сахаров разнообразные кислоты и спирты, тогда как хороший силос должен содержать только лактат и ацетат [9, 25].

Для изучения роли протеолитических клостридий в изменении биохимического состава силосов проведены эксперименты по силосованию клевера и кукурузы в лабораторных условиях. Согласно данным микробиологического анализа (табл. 2), в клеверном силосе количество анаэробов и их спор возрастало к концу опыта. К этому времени снизилось качество силоса: отмечены интенсивный катаболизм аминокислот до аммиака, накопление бутирата, ацетата, неидентифицированного азота, характерного для некачественного корма [22]. Внесение молоч-

Накопление летучих кислот в гнотобиотическом силосе из клеверной массы, простерилизованной дробно

Вариант	7 сут					45 сут				
	общее, мг %	в т. ч., %				общее, мг %	в т. ч., %			
		формат	ацетат	пропионат	бутират		формат	ацетат	пропионат	бутират
Молочно-кислые	203,1	5,2	92,7	2,1	0,0	361,3	5,1	90,7	4,3	0,0
Молочно-кислые + Clostridium	316,3	9,0	72,6	8,2	10,2	311,0	7,1	92,4	0,0	0,5
Протеолитические Clostridium	737,3	11,3	78,0	5,9	2,4	682,3	4,4	94,4	0,2	1,1
Молочно-кислые + гнилостные + Clostridium	214,5	5,4	92,7	1,9	0,5	682,2	4,6	94,3	1,2	0,0
Clostridium + гнилостные	1162,2	4,6	90,5	2,6	2,4	1160,0	4,5	80,5	1,2	3,6

но-кислой закваски в клеверный силос способствовало более полному сохранению сахаров и азотистых веществ корма, в том числе незаменимых аминокислот — треонина и аргинина. В результате повысилась класность силоса. Закваска не обеспечивала стабильности качества силоса, что побудило нас к детальному изучению процессов силосования.

В гнотобиотических силосах из облученной массы клевера внесенные культуры развивались слабо. Лучше они развивались в клеверной массе, простерилизованной дробно. Численность спорных анаэробов возрастала к 45-м суткам в присутствии молочно-кислых и гнилостных бактерий. Максимальное накопление летучих кислот отмечалось в силосах с протеолитическими клостридиями и клостридиями в сочетании с гнилостными аэробами (табл. 8). При этом в составе кислот преобладал ацетат. Наиболее интенсивный синтез бутирата происходил в течение первой недели ферментации в силосе с протеолитическими Clostridium и молочно-кислыми бактериями, а к 45-м суткам — в силосе с Clostridium в сочетании с гнилостными аэробами. Основную роль в катаболизме аминокислот и накоплении аммиака в силосе играли протеолитические клостридии. Так, в силосе с протеолитическими клостридиями снижалось содержание аспартата, треонина, метионина и аргинина, а также глутамата. Потери последнего, по данным [25], связаны с деятельностью растительных ферментов.

Суммируя все приведенные выше данные, можно заключить, что протеолитические Clostridium в силосуемой массе бобовых участвуют в катаболизме как азотистых, так и сахаристых веществ. Указанные анаэробы участвуют в накоплении летучих кислот в силосе. Ход брожения у протеолитических Clostridium зависит от видовых и штаммовых особенностей. Применение молочно-кислой закваски при силосовании клевера не гарантирует подавления спорных анаэро-

бов. Фактором, лимитирующим развитие протеолитических Clostridium в силосе, может быть понижение активности воды сырья до уровня менее 0,955, а также подкисление сырья.

Выводы

1. Протеолитические анаэробы рода Clostridium выявлены во всех изучавшихся производственных и лабораторных силосах в количестве, достигающем $5 \cdot 10^5$ клеток на 1 г сухого вещества, количество спор колебалось от 0 до $4 \cdot 10^5$.

2. В силосной массе клевера развиваются штаммы *C. sporogenes*. Впервые из силоса выделен штамм *C. subterminale*. Протеолитические клостридии, развивающиеся в силосе, способны к активной трансформации белковых веществ и сбраживанию достаточно широкого спектра углеводов. От клостридий, выделенных из других субстратов, они отличаются большей кислотоустойчивостью, меньшим относительным содержанием ацетата и формата в составе летучих кислот — метаболитов глюкозы, большей устойчивостью к содержанию в среде кислорода и перекиси водорода.

3. При снижении pH и активности воды в среде уменьшались протеолитическая активность культур и общее количество летучих кислот в культуральной жидкости, а в составе летучих кислот преобладал ацетат. Количество и состав летучих кислот у Clostridium при разных температурах культивирования зависели от штаммовых особенностей. Влияние биологических факторов на метаболизм Clostridium также определялось видовой и штаммовой вариабельностью. В буферной среде молочно-кислые палочки являются комменсалами для некоторых штаммов *C. sporogenes* и *C. acetobutylicum*. В присутствии гнилостных аэробов возрастает общая продукция летучих кислот у Clostridium.

4. Развитие протеолитических клостридий в клеверных силосах протекает длительно, сопровождается сбраживанием углеводов до летучих кислот, в основном ацетата, и разложением азотистых веществ до аммиака и неидентифицированных форм азота. В гнотобиотических силосах через 7 сут максимальное количество бутирата накапливалось в варианте *Clostridium* + молочно-кислые

бактерии, а в конце — в варианте *Clostridium* + гнилостные аэробы.

Повышение буферности силосуемой массы клевера вследствие усиленного накопления летучих кислот у гнилостных аэробов и анаэробов способствует стимуляции клостридий молочно-кислыми бактериями и повороту процессов силосования в сторону гнилостных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вернигор В. А., Таранов М. Т. Консервирование кормов. Алма-Ата: Кайнар, 1974, с. 213—220. — 2. Горова А. К. Протеолитические анаэробы рода *Clostridium* и их роль в трансформации белковых веществ в почве. — Автореф. канд. дис. М., 1979. — 3. Горова А. К., Гудков А. В. Выделение протеолитических *Clostridium* из объектов внешней среды. — В сб.: Вклад молодых специалистов в повышение качества и эффективности производства в маслоделии и сыроделии. Ярославль, 1978, с. 104—107. — 4. Гриневич А. Г., Живаева А. В. Закваски для лечебных кисло-молочных продуктов. — В сб.: Биол. микроорганизмов и их использование в нар. хоз-ве. Иркутск, 1975, вып. 2, с. 146—151. — 5. Гудков А. В., Михлин Э. Д., Полянин А. Н. Приготовление и применение закваски для силосования кормов. — В сб.: Науч. основы консервирования кормов. АН СССР, ВАСХНИЛ, Науч. центр биол. исслед. в Пушкино, 1976, с. 39—45. — 6. Гудков А. В., Перфильев Г. Д. Определение возбудителей масляно-кислого брожения в сырах. — Молочная промышленность, 1978, № 1, с. 15—20. 7. Егоров Н. С. Микробы-антагонисты и биологические методы определения антибиотической активности. М.: Высшая школа, 1965. — 8. Емцев В. Т., Николаева С. Н. Сравнение изучения некоторых биологических особенностей *Clostridium*, выделенных из пищевых продуктов при их консервировании. — Науч. докл. высш. школы, сер. биол. науки, 1971, № 12, с. 92. — 9. Зубрилин А. А., Мишустин Е. Н., Харченко В. А. Силос. М.: Изд-во с.-х. литры, 1950. — 10. Зубрилин А. А., Мишустин Е. Н. Силосование кормов. М.: Изд-во АН СССР, 1958. — 11. Климовский И. И., Гудков А. В., Звягинцев В. Н. Совершенствование методов подбора, производства и применения бактериальных заквасок с целью улучшения качества сыра. Углич, 1968. — 12. Мишустин Е. Н. Микробиологические процессы при силосовании кормов. — В сб.: Силосование и технология кормов, М.: Колос, 1964. — 13. Мишустин Е. Н., Емцев В. Т. Почвенные азотфиксирующие бактерии рода *Clostridium*. М.: Наука, 1974. — 14. Недялков С. — Известия на института по сравнителна патология на домашните животни. Кн. 8, София, 19, с. 54. — 15. Орлов А. П. О возбудителях масляно-кислого брожения в силaje. — Тр. ВНИИ с.-х. микробиол., 1938, т. 10, с. 68—73. — 16. Перфильев Г. Д., Гудков А. В. Возможные пути энергетического обмена возбудителей масляно-кислого брожения в сырах. — Тр. ВНИИМС, 1979, вып. 30, с. 3—12. — 17. Починок Х. Н. Методы биохимического анализа растений. Киев: Наукова думка, 1976. — 18. Чижи́к Г. Я. Значение аэробной микрофлоры в возникновении масляно-кислого брожения в силaje. — Автореф. канд. дис. М., 1952. — 19. Чижи́к Г. Я. О масляно-кислых бактериях, выделенных из силоса. — Уч. зап. ЛГУ, сер. биол. науки, 1955, вып. 39, с. 241—245. — 20. Allen L. A., Harrison J. — *Ann. Appl. Biol.*, 1937, N 1, p. 24. — 21. Beerens H., Castell M., Put H. — *J. Agric. Sci., Camb.*, 1962, vol. 103, N 1, p. 117. — 22. Hughes A. — *J. Agric. Sci., Camb.*, 1970, vol. 75, p. 421. — 23. Langston H. et al. — *US Dep. Agric. Tech. Bull.*, 1958, N 1187, p. 73. — 24. McDonald et al. — *J. Sci. Food Agr.*, 1964, v. 15, N 7, p. 429. — 25. Oshihima M., McDonald P. — *J. Sci. Food Agr.*, 1978, vol. 29, N 6, p. 27. — 26. Rosenberger P. — *Proc. Soc. Appl. Bact.*, 1959, vol. 14, N 2, p. 126. — 27. Scott W. — *Adv. Food Res.*, 1957, vol. 7, p. 84. — 28. Smith L. D., Hobbs L. — *Bergey's Manual of Determ. Bact.* 8th ed. Baltimore 29. Taha S. et al. — *Egypt. j. Microbiol.*, 1976, col. 11, N 1—2, p. 19.

Статья поступила 26 октября 1983 г.

SUMMARY

Fermentation process with proteolytic *Clostridium* is determined by specific peculiarities and water pH and activity. In clover ensilaging the application of lactic-acid ferment does not guarantee the inhibiting of sporous anaerobic bacteria. Reduction of substrate water activity and substrate acidification can be the factors limiting the development of clostridium in silage.