

УДК 576.8.095:636.085.52

РАЗВИТИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ CLOSTRIDIUM, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ СИЛОСОВ, ПРИ РАЗНЫХ ТЕМПЕРАТУРЕ, АКТИВНОСТИ ВОДЫ И pH СРЕДЫ

Е. А. АЛЕШИНА

(Кафедра микробиологии)

Основной причиной порчи герметично уложенной силосной массы является развитие в ней споровых анаэробов рода *Clostridium* — практически единственных конкурентов молочнокислых бактерий в силосе [18, 23]. Представители сахаролитической группы *Clostridium* — маслянокислые бактерии — изучены достаточно полно. Они отличаются пластичностью метаболизма и способностью сбраживать лактат силосов в бутират, что приводит к повышению pH и порче корма [11, 14, 17]. Известно, что развитие протеолитических *Clostridium* в силосе сопровождается катаболизмом аминокислот, накоплением аминов и аммиака в нем [20, 24]. Однако в литературе отсутствуют сведения о биологических особенностях представителей протеолитической группы *Clostridium*, способных развиваться в силосе, а также о влиянии на их рост и метаболизм различных факторов, важных для процессов силосования. Нами было показано [1], что протеолитические *Clostridium*, выделенные из силоса, могут не только ассимилировать азотистые вещества, но и способны сбраживать углеводы. Представляет интерес изучить развитие данных бактерий и образование ими продуктов брожения глюкозы в зависимости от условий культивирования. К факторам, влияющим на развитие микрофлоры в силосуемой массе, прежде всего относятся уровень активной кислотности, влажность сырья и температура.

Гнилостные бактерии относительно чувствительны к pH. Считается, что рост протеолитических *Clostridium* в силосе подавлен при pH около 5,5 [14]. В отличие от них маслянокислые бактерии способны продолжать медленный рост при pH выше 4,7 [9]. В кислой среде суммарное продуцирование кислот у *Cl. tyrobutyricum* снижается и в составе их возрастает доля ацетата [12]. В силосе из высокобелкового бобового сырья молочнокислое брожение протекает медленно и pH массы остается в пределах, допускающих развитие протеолитических анаэробов. Это аспект в литературе освещен недостаточно [21, 24].

Температура силосуемой массы обуславливается как ее самонагреванием, так и температурой окружающей среды. В случае рыхлой укладки масса может нагреться до 45° и выше [8]. Снижение температуры до 20° сильнее ингибирует *Clostridium*, чем молочнокислых бактерий [14]. В лабораторных силосах при 22° не наблюдалось развития протеолитических анаэробов [20]. Ряд авторов [15, 16] указывали на варьирование количества летучих кислот — продуктов брожения глюкозы у анаэробов при разных температурах культивирования.

Важным фактором является и влажность сырья (или содержание в нем сухого вещества). Для подавления нежелательной микрофлоры в силосе, в том числе споровых анаэробов [14, 19], часто прибегают к предварительному подвяливанню сырья. В результате снижается степень доступности влаги для микроорганизмов, выражаемая понятием «активность воды» (A_w). Она прямо пропорциональна количеству влаги, связанной растворенными в водной фазе субстрата веществами [13]. При содержании сухого вещества в силосе 30—35% A_w составляет около 0,987, что ниже оптимума для *Clostridium* (0,995) [3, 25]. В то же время маслянокислое брожение в силосе может иметь место и при

содержании сухого вещества 60—65 % [2]. Есть общее указание на то, что уровень A_b в среде влияет на состав метаболитов у *Clostridium* [7].

Из приведенного материала видно, что уровни pH, температуры и активности воды в силосуемой массе оказывают существенное влияние на рост и метаболизм протеолитических анаэробов. В то же время нет литературных данных, характеризующих рост и метаболизм этих силосных бактерий при различных условиях культивирования *in vitro*.

В задачи наших исследований входило изучить рост протеолитических *Clostridium*, выделенных из силосов, при различных уровнях pH, температуры и активности воды, определить количество и соотношение продуктов брожения глюкозы и влияние на эти показатели уровней pH, температуры и активности воды.

Материалы и методы

Культуры протеолитических *Clostridium* были выделены из горохо-овсяного, клеверного, кукурузного силосов и идентифицированы как *Cl. subterminale*, *Cl. sporogenes* (штаммы 502, 602 и 707) и *Cl. acetobutylicum*. При изучении роста культур использовали нефелометрический метод. *Clostridium* выращивали в пробирках в жидкой среде СПА (гидролизат казеина — 50,0 %, пептон — 3,0, дрожжевой автолизат — 4,0, хлорид натрия — 0,3, ацетат натрия — 0,1 %, смесь микроэлементов по Форду — 10 мл/л, pH 7,2 [5]). Влияние температуры и pH на количество и состав продуктов брожения устанавливали при культивировании бактерий в колбах в течение 3 сут в питательной среде СДА (глюкоза — 0,5 %, ацетат натрия — 0,5, дрожжевой автолизат — 2,0, растворимый крахмал — 0,1 %, гидролизованное молоко, разведенное водой 1:2 — до 1 л, pH 7,1—7,2 [6]). Обе среды содержали 0,05 % солянокислого цистеина в качестве редуктанта. Среды готовили на фосфатном буфере с pH 4,8, 5,3, 5,5 — для определения возможности роста *Clostridium* в кислой среде и с pH 5,7, 6,0 и 7,0 — для изучения влияния кислотности на брожение глюкозы.

Рост бактерий оценивали при температурах 12, 15, 20, 28, 30, 37, 40 и 43°, накопление продуктов брожения — при 20, 30 и 40°.

Влияние уровня активности воды на развитие культур изучали в питательной среде, содержащей пептон — 0,5 %, глюкозу — 0,5, дрожжевой автолизат — 1,0, цистеин солянокислый — 0,05, ацетат натрия — 0,05 %, мясной бульон — до 1 л, pH 6,8; A_b основы, по данным Г. Долидзе [7], — 0,997. Изучаемые уровни A_b — 0,995, 0,970, 0,960 и 0,955 (предельное значение для роста *Cl. sporogenes* [25] —

создавали, добавляя хлорид натрия соответственно в количестве (г/л): 5, 50, 66,6 и 75.

Количество и состав летучих жирных кислот и спиртов, образуемых бактериями, определяли методами газо-жидкостной хроматографии. Летучие кислоты выделяли из культуральной жидкости паровой дистилляцией, выпаривали в пенициллиновых флаконах, метилировали и идентификацию эфиров жирных кислот проводили на газо-жидкостном хроматографе Chrom-1 с пламенно-ионизационным детектором и стальной спиралевидной колонкой диаметром 3 мм. В качестве твердого носителя использовали целит 545, жидкой фазы — смесь реоплекса 400 с 2 % раствором фосфорной кислоты. Газ-носитель — азот, скорость подачи 60 мл/мин, температура термостатирования 80°. Летучие кислоты идентифицировали по времени удержания пиков соответствующих метиловых эфиров в порядке возрастания молекулярной массы муравьиной, уксусной, пропионовой и масляной кислот.

Для определения спиртов 1 мл дистиллята, полученного из культуральной жидкости, обрабатывали в пенициллиновых флаконах 0,5 мл 50 % раствора трихлоруксусной кислоты и 0,25 мл 30 % раствора нитрита натрия. Через 1—2 мин 1 мл газовой фазы вводили в газо-жидкостный хроматограф ЛХМ 8 МД с пламенно-ионизационным детектором и 2-метровой стальной колонкой. Твердый носитель — целит 545, жидкая неподвижная фаза — β , β' -оксипропионитрил (10 %), газ-носитель — азот, его скорость 30 мл/мин. Температура хроматографирования 20°. Идентификацию спиртов проводили по времени выхода стандартных алкилнитритов [10].

Результаты и обсуждение

Начальный уровень pH среды сильно влиял на рост *Clostridium*. Снижение pH с 7,0 до 6,0 привело к удлинению лаг-фазы с 4 до 11 ч, при pH 5,5 она длилась 20—24 ч, но после 96 ч культивирования pH среды достигал 6,5 и накопление биомассы быстро возрастало. Изучавшиеся штаммы были способны к росту в среде с начальным pH 5,3 после длительной лаг-фазы (36 ч и более). При pH 4,8 развития культуры не наблюдалось в течение 7 сут.

Количество и состав летучих кислот у штаммов *Clostridium* в зависимости от pH среды

Штаммы	Сумма кислот		Соотношение кислот, %			
	мг%	% к максимуму	формиат	ацетат	пропионат	бутират
pH 7,0						
502	57,42	100,0	42,6	23,6	23,1	10,7
602	40,55	100,0	31,0	61,2	0,0	7,8
707	57,66	100,0	27,3	60,0	6,6	6,1
pH 6,0						
502	45,69	79,6	37,6	49,0	6,5	6,9
602	16,11	39,7	17,1	66,9	7,2	8,8
707	21,19	36,8	18,5	62,3	3,4	11,8
pH 5,7						
502	14,42	25,1	14,5	82,5	0,9	2,9
602	4,00	9,9	17,0	78,8	1,2	3,0
707	0,96	1,7	42,7	57,3	0,0	0,0

В среде с глюкозой *Clostridium* накапливали в основном ацетат (табл. 1). Анализ состава кислот у бактерий при pH 7,0 выявил значительную вариабельность соотношения метаболитов, особенно пропионата. Содержание бутирата невысокое, что характерно для протеолитических *Clostridium* в отличие от маслянокислых, продуцирующих в основном бутират [22]. Сопоставление состава метаболитов у силосных протеолитических и почвенных протеолитических *Clostridium* [4] показывает, что у последних формиата в составе кислот меньше примерно в 10 раз, а ацетата несколько больше и он является основным продуктом брожения. У силосных бактерий формиат был вторым продуктом после ацетата.

При подкислении среды до pH 5,7 общее количество кислот снижалось, особенно у штамма 707. При этом у штаммов 502 и 602 значительно возросло содержание ацетата, а у штамма 707 оно существенно не изменилось. Аналогичное возрастание доли ацетата в составе кислот при подкислении среды наблюдалось у маслянокислых бактерий [12]. Содержание формиата, пропионата и бутирата при подкислении среды снижалось у всех штаммов, кроме 707, а доля пропионата и бутирата у штаммов 602 и 707 была наибольшей при pH 6,0. Штаммы 502 и 602 продуцировали бутират даже при pH 5,7.

Протеолитические *Clostridium* усваивали глюкозу с образованием алифатических спиртов в культуральной жидкости. Содержание их также зависело от pH среды (табл. 2). В наибольшем количестве изучавшиеся бактерии продуцировали этанол. Изобутанола и пентанола у них в отличие от почвенных штаммов не найдено [4]. Штамм *Cl. subterminale* накапливал небольшое количество пропанола (7 % общего

Таблица 2

Образование спиртов у *Clostridium* (мг%) в зависимости от pH среды

Виды и штаммы	pH 7,0			pH 5,7		
	этанол	пропанол	бутанол	этанол	пропанол	бутанол
<i>Cl. subterminale</i>	133,8	10,0	Следы	128,4	Следы	0,0
<i>Cl. sporogenes</i> 502	133,4	Следы	»	129,4	»	0,0
<i>Cl. sporogenes</i> 707	121,1	»	»	109,0	0,0	0,0
<i>Cl. acetobutylicum</i>	132,8	»	3,0	132,5	Следы	Следы

Количество и состав летучих кислот у *Cl. sporogenes* в зависимости от температуры

Штаммы	Сумма кислот		Соотношение кислот, %			
	мг%	% к максимуму	формиат	ацетат	пропионат	бутират
20°						
502	27,65	44,3	35,6	47,8	7,6	9,0
602	4,41	4,7	17,9	25,6	0,0	56,5
707	68,04	70,7	25,4	42,1	8,4	24,1
30°						
502	62,37	100,0	26,4	58,3	5,3	10,1
602	94,88	100,0	2,5	62,8	4,4	30,0
707	74,88	100,0	24,6	64,0	4,7	6,6
40°						
502	5,23	8,4	30,0	15,7	0,0	54,3
602	42,27	49,6	1,8	72,4	10,0	5,8
707	3,88	5,2	10,1	16,8	0,0	73,2

количества спиртов), а *Cl. acetobutylicum* — бутанол (2,2 %). В кислой среде образование спиртов снижалось, особенно у *Cl. sporogenes* штамм 707 (на 10 %). У *Cl. acetobutylicum* оно изменялось незначительно.

Изучение отношения протеолитических бактерий, выделенных из силоса, к температуре показало, что они являются мезофильными микроорганизмами: максимум накопления биомассы у них наблюдался при 37°. Повышение температуры до 43° приводило к сокращению лаг-фазы у *Cl. sporogenes* и *Cl. subterminale* с 5 ч до 2—3, а у *Cl. acetobutylicum* — с 7 до 4 ч, однако накопление биомассы было, как правило, ниже, чем при 37°. При 28° лаг-фаза у штаммов составила 5—9 ч, а при 20° — 10—12 ч, причем последующее развитие было также замедленным. При 12° не было роста всех культур в течение 14 сут, в то время как *Cl. sporogenes*, выделенные из молочных продуктов, начинали расти при этой температуре [12]. При температуре 15° начало развития изучаемых культур отмечено через 10 сут культивирования.

Брожение глюкозы у *Clostridium* в разных температурных условиях также сопровождалось изменением количества и состава кислот (табл. 3). Максимальное продуцирование кислот наблюдалось при 30°. Суммарное количество их при 20° у штаммов 502 и 707 составило соответственно 44,3 и 90,7 % максимального, а при 40° образование кислот было существенно подавлено: соответственно 8,4 и 5,2 %. У штамма 602, наоборот, для образования кислот была благоприятна температура 40°, а не 20°. При 20° накопление кислот у *Cl. sporogenes* 602 составило 44,6 % максимума, т. е. этот штамм можно считать более «термофильным», чем 502 и особенно 707.

Основным продуктом брожения глюкозы при 30° у штаммов 502 и 707 был формиат, а у штамма 602 — бутират. Количество пропионата колебалось от 4,4 до 5,3, бутирата — от 6,6 до 30,3 %, что соответствует литературным данным по протеолитическим клостридиям, выделенным из других субстратов [4, 15]. Повышение температуры с 20 до 40° приводило к снижению относительного содержания формиата у штаммов 602 и 707, у штамма 502 оно было около 30 %. Оптимальной для образования ацетата у штаммов 502 и 707 была температура 30°, а у штамма 602 — 40°. При 40° *Cl. sporogenes* 602 накапливали также максимальное количество пропионата, в отличие от других штаммов, у которых оно последовательно снижалось с повышением температуры. Продуцирование бутирата у штамма 502 с ростом температуры возраста-

Количество и состав продуктов брожения у *Clostridium* в зависимости от активности воды

Штаммы	Сумма кислот		Соотношение кислот, %			
	мг%	% к максимуму	формнат	ацетат	пропионат	бутират
A _B 0,995						
502	52,81	86,2	3,7	82,3	4,5	9,5
602	54,41	85,9	2,5	79,8	4,2	13,5
707	63,69	60,8	4,3	74,4	4,3	14,0
A _B 0,970						
502	60,22	100,0	2,0	89,8	2,2	6,0
602	63,30	100,0	1,5	84,3	4,1	10,61
707	104,7	100,0	12,6	72,8	3,9	10,7
A _B 0,960						
502	23,21	38,5	4,7	89,1	3,8	2,4
602	35,55	56,3	7,5	83,7	4,8	4,0
707	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
A _B 0,955						
502	2,61	4,3	11,4	44,4	0,0	43,7
602	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
707	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

ло, у штамма 602 — снижалось, у 707 максимальное количество бутирата наблюдалось при 40°, а минимальное — при 30°.

Приведенные данные свидетельствуют об отсутствии общего для всех штаммов *Clostridium* закономерного изменения состава продуктов брожения в зависимости от температуры.

Напротив, уровень активности воды более закономерно воздействовал на развитие протеолитических бактерий, выделенных из силосов (табл. 4).

Максимальное количество летучих кислот отмечалось при A_B 0,970, а не при 0,995 (оптимум для *Clostridium*). Снижение A_B до 0,960 вызвало уменьшение образования кислот на 43,7—61,5% у штаммов 502 и 602, а штамм 707 не дал роста. В среде с предельным значением A_B 0,955 штамм 502 не был подавлен и слабо продуцировал кислоты (2,61 мг%). При снижении A_B доля бутирата сокращалась, а ацетата — возрастала (до A_B 0,960). Подобная тенденция наблюдалась и при подкислении среды. На образование пропионата все изучаемые уровни A_B, за исключением предельного, по-видимому, не влияли, но заметно воздействовали на состав остальных метаболитов.

Обобщая приведенные данные, можно заключить, что изучавшиеся бактерии в кислой среде способны к образованию из глюкозы летучих кислот, в основном ацетата и спиртов. При подкислении среды и снижении уровня активности воды наблюдался сдвиг метаболизма в сторону преимущественного синтеза ацетата. При предельном для *Clostridium* значении A_B 0,955 возможен рост отдельных штаммов *Cl. sporogenes* — обитателей силоса.

Выявленная относительная кислотоустойчивость силосных *Clostridium* указывает на возможность развития их в кислой среде силоса. Установлено наличие пластичности метаболизма протеолитических силосных *Clostridium*, как и у маслянокислых бактерий.

Приведенные данные, полученные *in vitro*, характеризуют тесную зависимость жизнедеятельности бактерий от каждого из изучаемых факторов культивирования. В силосе же среда обитания микроорганизмов неоднородна, имеются микрозоны, где сохраняются благоприятные ус-

ловия — оптимальный pH, наличие белковой защиты. Поэтому степень подкисления силосной массы, вероятно, должна быть больше, чем *in vitro*.

Выводы

1. Протеолитические *Clostridium*, выделенные из силосов, отнесены к мезофильным микроорганизмам. Они отличаются относительной кислотоустойчивостью и способны начать рост в забуференной среде при pH 5,3 после длительной лаг-фазы. Отдельные штаммы могут развиваться при предельно низком уровне активности воды (0,955).

2. Основным продуктом брожения глюкозы у изучавшихся бактерий в составе летучих кислот был ацетат, затем формиат; в составе спиртов преобладал этанол. Выявлена существенная штаммовая вариабельность метаболизма.

3. Максимальное количество кислот у *Clostridium* отмечено при 30°, pH 7,0 и A_w 0,970. Снижение pH и A_w среды приводило к уменьшению образования летучих кислот, в их составе увеличивалось относительное содержание ацетата. Количество спиртов при этом снижалось на 0,2—10,0%. Соотношение отдельных кислот при изменении температуры варьировало у разных штаммов без четкой закономерности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алешина Е. А. Анаэробная протеолитическая микрофлора силосов. — Изв. ТСХА, 1980, вып. 3, с. 181—184. — 2. Аузиньш К. Влияние влажности и температуры на микробиологические процессы при консервировании и хранении трав. — Автореф. канд. дис. Рига, 1974. — 3. Березовский А. А., Сидоров В. А. Влияние влажности зеленых растений на качество сенажа. — Вестн. с.-х. науки, 1973, № 6, с. 37—41. — 4. Горова А. К. Протеолитические анаэробы рода *Clostridium* и их роль в трансформации белковых веществ в почве. — Автореф. канд. дис. М., 1979. — 5. Горова А. К., Гудков А. В. Выделение протеолитических *Clostridium* из объектов внешней среды. — Всесоюз. конф. «Вклад молодых специалистов в повышение качества и эффективности производства в сыроделии и маслоделии». Ярославль, 1978, с. 103—104. — 6. Гудков А. В. Биология споровых анаэробов, вызывающих порчу сыров. — Автореф. канд. дис. Вологда, 1965. — 7. Долидзе Г. Влияние низина, режима тепловой обработки, активности воды и температуры хранения на жизнедеятельность споровой микрофлоры в плавленых сырах. — Автореф. канд. дис. Вологда — Молочное, 1974. — 8. Зубрилин А. А., Мишустин Е. Н. Силосование кормов. М.: Изд-во АН СССР, 1958, с. 186—190. — 9. Зубрилин А. А., Мишустин Е. Н., Харченко В. А. Силос. М.: Сельхозиздат, 1950. — 10. Новгородова Н. С., Бузов Н. П., Нейберт В. К. Определение алифатических спиртов в сыре. — Тр. ВНИИМС, 1978, вып. 24, с. 78—92. — 11. Орлов А. П. О возбудителях маслянокислого брожения в силлаже. — Тр. ВНИИ с.-х. микробиол., 1938, т. 10, с. 68—84. — 12. Перфильев Г. Д. Изучение биологии возбудителей маслянокислого брожения и разработка способов борьбы с ними в мелких сырах. — Автореф. канд. дис. М., 1979. — 13. Роуз Э. Химическая микробиология М.: Мир, 1971, с. 66, 106—107. — 14. Шмидт В., Веттерау Г. Производство силоса. М.: Колос, 1975. — 15. Ando I., Karashimado T. — Proc. TUS Jap. Conf. on Toxic Microorganisms. Honolulu, 1968, p. 416—426. — 16. Anema P. I. e. a. — J. Appl. Bact., 1973, vol. 36, p. 683—687. — 17. Bryant M. P., Burkey L. A. — J. Bact., 1956, vol. 74, p. 43—46. — 18. Gibson T. e. a. — J. Gen. Microb., 1958, vol. 19, p. 56—62. — 19. Gouet P. e. a. — Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys., 1965, vol. 5, p. 79—100. — 20. Gouet P. e. a. — Germfree Res. Biol. Effect. Gnotobiot. Environ., 1973, p. 649—656. — 21. Kemble A. R. — J. Sci. Food Agric., 1956, vol. 7, p. 125—130. — 22. Lewis V. L. e. a. — Can. J. Microb., 1967, vol. 13, p. 1033—1044. — 23. McDonald P. e. a. — Z. Tierphysiol. Tierernahr. Futtermilk, 1966, vol. 21, p. 103—110. — 24. Ohshima M. e. a. — J. Sci. Food Agric., 1979, vol. 30, p. 97—106. — 25. Scott W. J. — Adv. Food res., 1957, vol. 7, p. 84—123.

Статья поступила 6 ноября 1982 г.

SUMMARY

Proteolitic *Clostridium* were obtained from silages with different pH levels, temperatures and water activity. It was found that the given bacteria are mesophiles; they are comparatively resistant to lower pH values and water activity in the substrate. The products of fermentation of glucose with *Clostridium* are volatile acids, mainly acetate, and spirits, mainly ethanol. Under lower pH and water activity bacteria accumulated mainly acetate, their response to the change of temperature varying with the strain.