

УДК 576.852.24.095

ВЛИЯНИЕ NaCl НА РАЗВИТИЕ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ СИЛОСА И СЕНАЖА И ИХ АНТИБИОТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

Р. А. ЛАПОТЫШКИН, Г. И. ПЕРЕВЕРЗЕВА

(Кафедра микробиологии)

Физиологические и биохимические процессы, происходящие в микроскопических организмах, тесно связаны с поступлением воды и питательных веществ в их клетки. Вода является средой для растворения питательных веществ, а также необходимым компонентом цитоплазмы самой клетки.

Осмотическое давление клетки у большинства бактерий достигает 500—2000 кПа. Следовательно, растворы с высоким осмотическим давлением — порядка 900—10 000 кПа (15—20 % хлористого натрия) — делают рост бактерий и ряда других организмов невозможным [8]. Если одни микроорганизмы приспособились к большим концентрациям соли и она может быть даже стимулятором их роста, то другие отрицательно реагируют на ее присутствие в среде. Большинство бактерий не переносят концентрацию хлористого натрия выше 5 %.

Относительно устойчивости молочнокислых бактерий к повышенному осмотическому давлению среды литературные данные весьма ограничены. Из имеющихся сведений следует, что различные виды этих микроорганизмов по-разному относятся к присутствию хлористого натрия в среде. В частности, может наблюдаться адаптация молочнокислых бактерий к высоким концентрациям соли [4].

Немаловажной физиологической особенностью молочнокислых бактерий является их антибиотическая активность по отношению к другим микроорганизмам.

Молочнокислые бактерии, развиваясь в естественных условиях совместно с другими микроорганизмами, могут угнетать их или не оказывать на них благоприятного воздействия [4], а также испытывать определенное влияние последних [6]. Характер этих взаимоотношений зависит от многих факторов, и в первую очередь от состава среды, в которой развиваются микроорганизмы, температуры, соотношения между микроорганизмами [6], а также от концентрации и доступности основных частей субстрата, используемых ими в качестве питательных веществ [2].

Имеется немало указаний на антагонистические взаимоотношения между молочнокислыми бактериями и большинством микроорганизмов, выделенных из разных источников среды (молочные продукты, силос, почва и т. д.). Так, в консервированных кормах при затрудненном доступе воздуха молочнокислые бактерии постоянно подавляют развитие гнилостных бактерий [1], что может происходить за счет накопления в среде молочной кислоты, а также за счет выделения ими специфических антибиотических веществ. Таким образом, молочнокислые бактерии в определенных условиях обитания могут проявлять антагонизм к другим микроорганизмам и способны выделять в среду антибиотические вещества. Данные свойства, а также способность молочнокислых бактерий выживать при изменении осмотической активности в среде играют важную роль в консервировании растительной массы с пониженной влажностью.

В связи с этим нами была поставлена задача установить влияние хлористого натрия в среде на рост и выживание молочнокислых бактерий и других родов микроорганизмов (опыт 1), а также проверить действие метаболитов, выделяемых молочнокислыми бактериями в среду, на рост спорообразующих и неспорообразующих бактерий и дрожжей (опыт 2).

Методика исследований

Опыт 1. Здесь были изучены 8 культур молочнокислых бактерий, выделенных из силоса и сенажа, в сравнении с культурами *Escherichia coli* и тремя культурами дрожжей рода *Saccharomyces*, выделенных из сенажа.

Для создания разности осмотических давлений внутриклеточного содержимого микроорганизмов и внешней среды в культуральную среду (сусло) вносили хлористый натрий в концентрациях 4, 6—10 %. Среду инокулировали тремя каплями 24-часовой культуры и инкубировали в течение 3 сут

при температуре 30°. По истечении указанного времени определяли рост культур по мутности среды и изменению титруемой кислотности (Т°) в культуральных жидкостях молочнокислых бактерий.

О влиянии разных концентраций хлористого натрия на осмотическое давление в клетках молочнокислых бактерий судили по изменению размера клеток при увеличении $\times 900$.

Опыт 2. В этом опыте были взяты 12 культур молочнокислых бактерий (6 выделено из сенажа, остальные — из силоса) и указанные выше неспоросные культуры. Споросными тест-объектами служили *Bacillus megaterium* и *Bacillus mesentericus*. Молочнокислые бактерии K₅, K₇, K₈, K₁₀, K₁₄, Л₄, 118, 130, 132, 143, 145 и 147 высевались в жидкое сусло и выращивались в термостате в течение 3 сут при температуре 30°. Затем инокулаты с культурами центрифугировали при 5 тыс. об/мин. Из выросших на косяках тест-культур готовили суспензию в стерильной воде, затем по одной капле пипеткой вносили в чашки Петри на агаризованную среду (МПБ: жидкое сусло 0,5:1) и растирали шпательем. На поверхность среды с нанесенными тест-объектами помещали стеклянные цилиндрики, по 3 шт. на каждую культуру молочнокислых бактерий. В цилиндрики вносили стерильными пипетками по 3 капли центрифугата. Контролем служил раствор молочной кислоты с усредненной титруемой кислотностью для всех испытуемых культур молочнокислых бактерий (75°).

В связи с тем что антибиотические соединения не обладают способностью к быстрой диффузии через агаровые среды, чашки Петри с исследуемыми культурами предварительно выдерживали в холодильнике в течение 2 сут, для того чтобы антибиотик мог продиффундировать в среду. Только после этого чашки Петри помещали в термостат при температуре 30°. По истечении 3 сут инкубирования измеряли зоны угнетения тест-организмов, а по разности диаметра зон внесенного центрифугата и контроля судили о наличии антибиотика.

Результаты исследований

Культуры молочнокислых бактерий сенажа оказались более осмофильными, чем культура силоса. Они выдерживали концентрацию хлористого натрия 7—8% (культура 143 обладала способностью развиваться даже при 10% содержании соли в среде). Культуры молочнокислых бактерий силоса росли при содержании хлористого натрия в среде до 6%, при 7% рост этих культур был очень слабый и практически не давал помутнения сусла.

Микроскопический просмотр клеток культур молочнокислых бактерий силоса и сенажа, выращенных в растворе хлористого натрия, показал, что морфология клеток начинает изменяться при концентрации соли 6%. При этом клетки в отличие от контрольных (без хлористого натрия) приобретали удлиненную форму, искривлялись по центру и по периферии, у них наблюдалось образование длинных цепочек, состоя-

Т а б л и ц а 1

Выживаемость молочнокислых бактерий и их рост на агаризованном сусле после семисуточной инкубации в среде с хлористым натрием (концентрация в %)

Индикс культуры	Концентрация NaCl					
	4	6	7	8	9	10
Lactobacterium plantarum (силос)						
K ₅	+++	++	+	—	—	—
K ₇	+++	++	+	—	—	—
K ₁₀	+++	++	+	—	—	—
Вид не определен						
K ₁₄	+++	+++	++	+	—	—
Lact. plantarum var. amyolyticum (сенаж)						
132	+++	+++	+++	++	—	—
135	+++	+++	+++	++	—	—
143	+++	+++	+++	+++	+	+
145	+++	+++	++	+	—	—

Пр и м е ч а н и е. +++ сплошной рост; ++ хороший рост отдельными колониями (>10); + рост отдельными колониями (<10); — нет роста.

щих из 5—10 клеток, а также вздутие на концах. При более высокой концентрации соли (8%) клетки культур молочнокислых бактерий сенажа становились нитевидными с утолщениями на концах.

Для проверки выживаемости культур после 7-суточной инкубации в среде с возрастающими концентрациями хлористого натрия проводили поверхностный высев 0,1 мл суспензии на агаризованном сусле.

Как видно из табл. 1, культуры молочнокислых бактерий сенажа были более устойчивы к повышенным концентрациям хлористого натрия и сохраняли свою жизнеспособность.

Культуры дрожжей, кишечной палочки, *Ps. herbicola* и *Ps. fluorescens* отличались от молочнокислых бактерий отношением к хлористому натрию. Из трех культур дрожжей рода *Saccharomycetes* две развивались при концентрации хлористого натрия в сусле 4%, одна — при 6%. Кишечная палочка росла в среде с 2% содержанием соли, при 4% рост ее был очень слабым.

Если культуры дрожжей и *Escherichia coli* не выдерживали высокой концентрации хлористого натрия и погибали, то гнилостные микроорганизмы обладали способностью выживать при довольно высокой насыщенности раствора (до 7%). Однако культуры молочнокислых бактерий сенажа, приспособившись к высокой осмотической активности клеточного сока в условиях пониженной влажности, выдерживали большие концентрации хлористого натрия, чем культуры силоса, дрожжи и некоторые гнилостные микроорганизмы.

При объяснении влияния хлористого натрия на бактерии в [9] выдвигается на пер-

Антибиотические свойства молочнокислых бактерий по отношению к спорообразующим гнилостным микроорганизмам (зоны подавления роста в опыте — «О», разность к контролю — «Р», мм)

Индекс силосной культуры	Bac. megaterium		Bac. mesentericus		Индекс сенажной культуры	Bac. megaterium		Bac. mesentericus	
	О	Р	О	Р		О	Р	О	Р
К ₅	30	13	18	2	118	26	9	20	4
К ₇	26	9	25	9	130	22	5	18	2
К ₈	26	9	26	10	132	24	7	20	4
К ₁₀	25	8	27	11	143	17	0	16	0
К ₁₄	27	10	25	9	145	27	10	25	9
Л ₄	27	10	25	9	147	17	0	0	-16

вый план осмотическое действие солей. Находясь в среде с высокой концентрацией соли, клетки бактерий испытывают значительное осмотическое давление. В результате этого у несолеустойчивых бактерий происходит плазмолиз, у других бактерий, протопласт которых сросся с клеточной оболочкой, плазмолиз не наступает. Но в том и другом случае бактерии оказываются в условиях «физиологической засухи». Потребление питательных веществ из окружающей среды затрудняется. Кроме того, нарушаются некоторые жизненно важные функции клетки из-за ее обезвоживания [9].

Примерно в такие же условия микроорганизмы попадают в процессе заготовки сенажа, когда значительная часть воды растительных клеток теряется и тем самым затрудняется поступление питательных веществ в клетки микроорганизмов.

Провяливание растительной массы, приводящее к повышению осмотического давления, по-видимому, по-разному влияет на жизнедеятельность микробов [7]. У многих из них вырабатывается способность приспособляться к специфическим условиям физиологически сухой среды. Повышение осмотического давления в клетках микроорганизмов — это своеобразная реакция на недостаток влаги. Уровень давления является для данного организма стойким признаком, передаваемым генетически [7].

Итак, осмотическая активность культуры молочнокислых бактерий сенажа является фактором, обеспечивающим доминирующее положение их при приготовлении и дальнейшем хранении кормов с пониженной влажностью.

При исследовании антибиотической активности молочнокислых бактерий было выявлено, что они угнетают рост спорообразующих микроорганизмов и силосные культуры сильнее, чем сенажные. При этом К₅, К₁₄ и Л₄ оказывали более сильное подавляющее действие на Bac. megaterium, а К₈ и К₁₀ — на Bac. mesentericus (табл. 2).

Кроме спорообразующих гнилостных форм микроорганизмов, в нашем опыте использовались неспорозомные тест-организмы *Escherichia coli*, *Pseudomonas herbigicola*, *Ps. fluorescens*, *Saccharomyces*.

Молочнокислые бактерии силоса и сенажа угнетали рост кишечной палочки слабее, чем рост вышеизученных тест-организмов (табл. 3).

Разность зон угнетения кишечной палочки силосными культурами в опыте и контроле была незначительной (1—6 мм). Почти такое же воздействие на кишечную палочку оказывали и сенажные культуры. Что касается двух других неспорозомных тест-культур, относящихся к одному и тому же роду *Pseudomonas*, то они отличались большей устойчивостью к воздействию молочнокислых бактерий силоса и сенажа.

Т а б л и ц а 3

Антибиотические свойства молочнокислых бактерий по отношению к неспорозомным гнилостным микроорганизмам (зона подавления роста в опыте «О» и разность к контролю «Р», мм)

Индекс силосных культур	<i>Escherichia coli</i>		<i>Ps. herbigicola</i>		<i>Ps. fluorescens</i>		Индекс силосных культур	<i>Escherichia coli</i>		<i>Ps. herbigicola</i>		<i>Ps. fluorescens</i>	
	О	Р	О	Р	О	Р		О	Р	О	Р	О	Р
К ₅	15	3	15	-3	17	-1	118	19	7	0	-18	20	2
К ₇	14	2	16	-2	18	0	130	15	3	0	-18	15	-3
К ₈	13	1	18	0	21	3	132	16	4	20	2	17	-1
К ₁₀	13	1	0	-18	19	1	143	13	1	0	-18	17	-1
К ₁₄	18	6	11	-7	19	1	145	15	3	0	-18	15	-3
Л ₄	15	3	0	-18	18	0	147	13	1	0	-18	15	-3

Так, из 6 силосных культур только 4 давали зоны угнетения *Ps. herbicola*, которые не были больше зоны в контрольном опыте или оказались меньше их (табл. 3). По отношению к *Ps. fluorescens* силосные культуры проявляли слабую бактериостатическую способность. В отличие от силосных молочнокислых бактерий сенажа данные культуры совсем не угнетали роста гнилостных форм рода *Pseudomonas*, за исключением культур 143 и 118, которые слабо подавляли рост тест-организмов.

Таким образом, выделенные из силоса и сенажа молочнокислые бактерии проявляли слабую бактериостатическую активность по отношению к неспорообразующим гнилостным тест-организмам и не оказывали никакого действия на дрожжи рода *Saccharomyces*.

Угнетение роста испытуемых тест-культур могло происходить в результате воздействия молочной кислоты, выделенной молочнокислыми бактериями, и, вероятно, под влиянием антибиотических веществ. А поскольку для контроля использовали действие молочной кислоты на указанных выше тест-организмы, мы предположили, что разность зон угнетения роста тест-культур в опыте и контроле обусловлена действием специфических антибиотических веществ. Для проверки этого предположения мы провели дополнительный опыт, в котором был использован диффузионный метод количественного определения низина, основанный на способности данного антибиотика диффундировать в агаровую среду и образовывать зоны подавления роста тест-организма *Vac. coagulans* — более чувствительного к низину и, по-видимому, к другим антибиотическим веществам, выделяемым в среду молочнокислыми бактериями.

В опыте использовали две силосные культуры — K_5 и K_{10} и две сенажные — 118 и 143. Контролем служили стандартные растворы низина, концентрации которых были равны 8, 10 и 12 единицам Рединга, и раствор молочной кислоты концентрацией 75° Тернера. Стандартные растворы уменьшали зоны роста *Vac. coagulans* соответственно на 16, 17 и 18 мм. Чистая молочная кислота (контроль) не задерживала роста данного тест-организма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Голикова А. А. Взаимоотношения молочнокислых и гнилостных бактерий в условиях свободного и затрудненного доступа воздуха при силосовании. — В сб.: Микробиология на службе сельск. хоз-ва. М.: Сельхозгиз, 1959, с. 160. — 2. Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках. М.: Высшая школа, 1964. — 3. Ерзинкян Л. А. Антибиотические свойства некоторых молочнокислых бактерий кишечного тракта. — Сб. АН АрмССР, 1961, вып. 2, с. 177. — 4. Квасников Е. И. Биология молочнокислых бактерий. Ташкент: АН УзбССР, 1960. — 5. Квасников Е. И., Суденко В. И. Антибиотические свойства *Lactobacterium breve*. —

Как показали наши исследования, силосные и сенажные культуры молочнокислых бактерий угнетали рост *Vac. coagulans*, причем зоны угнетения варьировали в пределах 12—14 мм. По своему действию на тест-организм испытуемые культуры оказались идентичными. Наиболее активным антагонистом по отношению к *Vac. coagulans* была сенажная культура 118, которая образовывала зону угнетения диаметром 14 мм. Поскольку молочная кислота не действовала угнетающе на рост *Vac. coagulans*, то появление зоны его угнетения можно отнести к действию антибиотических соединений, выделенных молочнокислыми бактериями.

На способность молочнокислых бактерий выделять в среду антибиотические соединения указывалось ранее [2, 3, 5]. Эти соединения (низин, лактобревин, диплококцин и др.) оказывали бактериостатическое действие на развитие мясlesslyких бактерий, некоторых грамположительных (золотистый стафилококк), а также грамотрицательных (кишечная и дизентерийная палочки) микроорганизмов.

Последние данные [10] свидетельствуют о том, что молочнокислые бактерии посредством выделяемой ими перекиси водорода способны угнетать маслянокислые бактерии.

Выводы

1. Молочнокислые бактерии, выделенные из сенажа, обладали более высокой осмотической активностью по сравнению с культурами, выделенными из силоса, а также дрожжами и гнилостными микроорганизмами.

2. Испытуемые культуры молочнокислых бактерий силоса и сенажа угнетали рост споробразующих микроорганизмов, причем стдельные культуры — по-разному, и проявляли слабую бактериостатическую активность по отношению к неспороносным тест-культурам.

3. Угнетение роста тест-организмов может происходить за счет выделения в среду молочной кислоты и специфических антибиотических веществ.

Мікробіологічний журн., 1967, т. 29, вып. 2, с. 149. — 6. Королева Н. С. Техническая микробиология кислоломочных продуктов. М.: Пищевая пром-сть, 1966, с. 29. — 7. Мишустин Е. Н., Мессинев М. А. Осмотическое давление в клетке почвенных микробов в связи с их приспособлением к климату. — Микробиология, 1933, т. 2, вып. 1, с. 63. — 8. Мишустин Е. Н., Емцев В. Т. Микробиология. М.: Колос, 1970. — 9. Робертис Э. де, Саэс Ф., Новинский В. Биология клетки. М.: Мир, 1967, с. 369. — 10. Сорокина Н. И., Гудков А. В., Матевосян Л. С., Перфильев Г. Д., Хандак Р. Н. Свойства молочнокислых

палочек, обладающих антагонистическим действием на возбудителей маслянокислого брожения в сырах. — Вклад молодых специалистов в повышение качества и эффективности производства в маслоделии и сыроделии. Тез. докл. Всесоюз. науч.-техн. конфер. в Угличе, 1978. Ярославль, 1978. *Статья поступила 15 апреля 1980 г.*

SUMMARY

The results of studying physiological properties of lactic-acid bacteria isolated from clover silage and haylage are discussed.

Lactic-acid haylage bacteria suppressed the growth of sporiferous microorganisms by secreting lactic acid and specific antibiotic substances into the medium; they possessed higher osmotic activity than cultures isolated from silage.