

УДК 636.085.52:576.8

АНАЭРОБНАЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКАЯ МИКРОФЛОРА СИЛОСОВ

Е. А. АЛЕШИНА

(Кафедра микробиологии)

Качество силоса в большой мере зависит от характера биохимических процессов, протекающих в силосной массе. Направленность и скорость этих процессов во многом определяются деятельностью силосной микрофлоры.

В составе естественной микрофлоры силосуемой массы преобладают нежелательные гнилостные микроорганизмы. Представители этой группы — споровые анаэробы рода *Clostridium* — способны развиваться в силосе. По литературным данным, в силосах встречаются протеолитические клостридии видов *Cl. bifermentans*, *Cl. sporogenes*, а также *Cl. acetobutylicum* [5]. Низкая кислотность силосуемой массы подавляет их развитие, но при повышении pH они способны активизироваться. Развитие клостридий в силосе часто приводит к ухудшению органолептических показателей и питательной ценности корма вследствие разрушения в нем белков, накопления масляной кислоты, аммиака, сероводорода, аминов [3, 9]. Кроме того, при кормлении коров таким силосом споры клостридий через молоко попадают в сыр и, прорастая в нем при определенных условиях, могут быть причиной массового испускания и прогоркания продукта, особенно в зимний период [3].

В связи с ущербом, наносимым качеству кормов и сыров протеолитической клостридиальной микрофлорой силосов, и недостаточной изученностью биологии этих микроорганизмов были поставлены следующие задачи: установить их численность на разных этапах силосования, определить видовую принадлежность и протеолитическую активность культур, выделенных из силосов в производственных и лабораторных условиях.

Объекты и методы исследований

Изучались микробиологические и биохимические показатели пяти производственных и трех лабораторных силосов. Работа проводилась в отделе микробиологии ВНИИ маслоседелной и сыродельной промышленности (г. Углич). Пробы производственных силосов были взяты в 1977 г. в двух хозяйствах Угличского района с глубины траншей около 1 м с помощью силосного бура.

В 1978 г. в лабораторных условиях проведен опыт по силосованию зеленой массы клевера с молочнокислой закваской и без нее, а также зеленой массы кукурузы без добавок. Закваску вносили в измельченную

массу с помощью пульверизатора из расчета $2,5 \cdot 10^{10}$ клеток на 1 г свежей массы; в контроле — эквивалентное количество воды. Сырье плотно укладывали в бутылки по 0,4 кг, герметизировали и инкубировали при 28°. Силосы анализировали до инкубации и через 1, 3, 5, 7, 15 и 45 сут. Уровень pH определяли потенциометрически, содержание аммиака — методом Конвея, общего азота — по Кьельдалю, масляной кислоты — методом газожидкостной хроматографии; численность анаэробов — путем высева разведений силосной суспензии в жидкие питательные среды и оценки наиболее вероятного числа микроорганизмов с помощью таблиц Маккреди с пересчетом на 1 г сухого вещества. Общую численность анаэробов устанавливали на пептонно-дрожжевой среде [7], лактаферментирующих анаэробов — на лактатно-ацетатной среде ЛАСА [4], ацетонобутиловых анаэробов — на 5 %-ном кукурузном заторе [7], протеолитических анаэробов — на среде ССА с антибиотиками полмиксином и неомцином [1]. Численность спор клостридий определяли на среде СДА [2] с пастеризацией при 80° в течение 10 мин. Все среды содержали 0,05 % солянокислого цистина в качестве редукента и 0,004 % нейтральрота — специфического индикатора развития анаэробов. Перед посевом среды кипятили не менее 20 мин для удаления растворенного в них воздуха. Посевы инкубировались 7 сут при 37°. Критериями роста клостридий были: изменение цвета нейтральрота с красного на флуоресцирующий желтый и микроскопическая картина; дополнительно для анаэробов, выявляемых на ЛАСА, — газообразование, а для протеолитических — гнилостный запах.

ССА и кукурузный затор с признаками роста протеолитических анаэробов послужили исходным материалом для получения накопительных и затем чистых культур клостридий. Очистку накопительных культур проводили в несколько этапов, включавших многократные пересевы их на среде ССА с антибиотиками, пересевы на той же среде с пастеризацией и затем пересевы разведений культур на агаризованной ССА в запаянных трубках Вейона. Извлеченные из последних колонии анаэробов дали начало рабочим штаммам клостридий. Чистые культуры удалось получить в результате многократных посевов разведений накопительных культур на поверхность и в толщу агаризованной среды ССА с антибиотиками и без них в

Таблица 1

Результаты микробиологических и биохимических анализов производственных силосов

Вид сырья	Возраст, сут	Наиболее вероятное число анаэробов, кл/г, на средах			рН	Масляная кислота, мг%
		ЛАСА	ССА + антибиотики	СДА		
Горох + овес	15	$6 \cdot 10^4$	$6 \cdot 10^2$	$4 \cdot 10^5$	4,23	—
Разнотравье	45	0	$9 \cdot 10^2$	$2 \cdot 10^4$	3,95	3,3
Клевер	45	0	$2 \cdot 10^2$	$4 \cdot 10^3$	3,97	3,8
Тимофеевка	60	0	$7 \cdot 10^2$	$4 \cdot 10^3$	4,05	1,1
Клевер + тимофеевка	90	0	$5 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^2$	3,94	1,1

чашках Петри при инкубировании в анаэробных условиях при 37° в течение 3—5 сут. Отдельные колонии переносили с агара в жидкую среду ССА и пастеризовали. Полученные в конечном счете культуры считались чистыми при отсутствии роста на косом мясопептонном агаре в аэробных условиях и в мясопептонном бульоне (в низком и высоком слое), а также при однородности микроскопической культуры. Чистые культуры хранили в среде Кит-Тароци под слоем вазелинового масла при 18° .

Идентификацию штаммов проводили в соответствии с определителем Берге [8] по отношению к желатине, ряду сахаров, наличию определенных ферментов и свойств. Протеолитическую активность культур определяли по схеме И. И. Климовского при культивировании их в стерильном обезжи-

ренном молоке в течение 4 сут с последующим определением убыли содержания белков и прироста пептидов и общего количества свободных аминокислот в культуральной жидкости [1].

Результаты исследований и их обсуждение

Из табл. 1 следует, что клостридии имеются в силосах с низкой активной кислотностью. Интенсивность развития клостридий зависит от рН: в результате статистической обработки данных установлено, что наиболее вероятное число жизнеспособных клеток в силосе, выявляемых на СДА, прямо пропорционально уровню рН ($r = +0,93$). Наиболее опасные для сыроделия лактатферментирующие клостридии выявлены только в

Таблица 2

Динамика микробиологических и биохимических показателей в лабораторных силосах

Возраст силоса, сут	Наиболее вероятное число анаэробов, кл/г, на средах				рН	Аммиак, мг%	Общий азот, %	Масляная кислота, мг%
	пептонно-дрожжевая	кукурузный загор	ССА + антибиотики	ЛАСА				
Клеверный силос без закваски								
0	0	0	0	0	5,90	0	1,17	0
1	$6 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^6$	0	0	5,15	0,063	—	0
5	0	$6,5 \cdot 10^5$	0	0	5,03	308	—	0
7	0	$3,0 \cdot 10^7$	$3,0 \cdot 10^6$	0	5,25	574	2,55	0
15	0	$3,0 \cdot 10^4$	$3,0 \cdot 10^4$	$1,3 \cdot 10^4$	5,56	770	—	82,2
45	0	$1,3 \cdot 10^5$	$1,3 \cdot 10^4$	$1,3 \cdot 10^4$	5,68	1092	1,71	162
Клеверный силос с закваской								
1	$1,3 \cdot 10^4$	$3,0 \cdot 10^6$	$1,3 \cdot 10^5$	0	4,65	0	—	0
3	0	0	$3,0 \cdot 10^3$	0	4,48	21	—	0
5	0	0	0	0	4,43	49	2,94	0
7	0	$1,3 \cdot 10^3$	0	0	4,75	266	—	0
15	$3,0 \cdot 10^2$	$1,3 \cdot 10^3$	0	0	4,76	286	—	Следы
45	$1,3 \cdot 10^2$	$2,5 \cdot 10^4$	Менее 30	$3 \cdot 10^2$	4,72	630	3,0	»
Кукурузный силос								
1	0	$3,0 \cdot 10^2$	Менее 10	0	6,45	0	1,12	Следы
0	$1,3 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^6$	$6,5 \cdot 10^4$	0	6,18	56	—	0
3	0	$1,3 \cdot 10^2$	Менее 10	0	4,20	529	—	Следы
7	0	$1,3 \cdot 10^4$	0	0	4,48	140	2,81	0
15	0	$1,3 \cdot 10^3$	0	0	5,15	343	—	0
45	0	$1,3 \cdot 10^2$	0	0	4,23	316	1,27	0

Протеолитическая активность *Clostridium* в молоке

Объект	Белки, %	Пептиды, %	Аминокислоты, мг%
Молоко	3,89	0,104	9,23
% к содержанию в молоке*			
<i>Cl. subterminale</i>	-3,57	+1,93	+33,46
<i>Cl. sporogenes</i>			
штамм № 122	-3,55	+1,17	+29,73
» 206	-2,96	+1,55	+20,67
» 404	-3,82	+1,68	+28,09
» 502	-3,59	+1,66	+42,66
» 602	-3,43	+1,50	+30,60
» 707	-2,56	+1,57	+12,39
<i>Cl. acetobutylicum</i>	-2,85	+2,15	+8,68

* Аминокислоты—в мг% к содержанию в молоке.

одном образце. Содержание масляной кислоты было выше в молодых силосах с более энергичными микробиологическими процессами.

Из производственных силосов были получены 22 накопительные культуры на среде ССА с антибиотиками, а в результате их очистки — 6 чистых культур клостридий, из которых 5 штаммов идентифицированы как *Cl. sporogenes* и один как *Cl. subterminale*. Таким образом, среди анаэробов, выявляемых на среде ССА с антибиотиками, преобладали микроорганизмы вида *Cl. sporogenes*. Новым явилось выделение из горохо-овсяного силоса штамма *Cl. subterminale*.

Представляло интерес проследить за динамикой численности протеолитических анаэробов на разных стадиях процесса силосования (табл. 2).

Как видно из табл. 2, численность клостридиальной микрофлоры силосов зависит от состава растительной массы, стадии процесса силосования, интенсивности молочнокислого брожения. Так, наиболее интенсивное развитие клостридий, учитываемых на кукурузном заторе, происходило в клеверном силосе. В кукурузном силосе этих микроорганизмов было на 1—2 порядка меньше. Подобная тенденция наблюдалась и в отношении микроорганизмов, учитываемых на средах ССА и ЛАСА.

Размножение клостридий в силосе начинается, по-видимому, в первые же часы его закладки. К концу первых суток их численность возрастает в тысячи и миллионы раз. В более поздние сроки постепенно количество жизнеспособных клеток уменьшается и к 15-м суткам составляет 0—10 % максимального уровня. В этот период преобладают микроорганизмы, выявляемые на ССА с антибиотиками. В 45-суточном силосе наблюдается небольшое увеличение численности жизнеспособных клеток, накопление аммиака и масляной кислоты, являющихся конечными продуктами энергетического обмена клостридий. В конце опыта начинают численно преобладать анаэробы, выявляемые на кукурузном заторе и ЛАСА (табл. 2).

Результаты лабораторных опытов подтвердили влияние активной кислотности силосов на рост споровых анаэробов. При рН ниже 5,0 практически полностью подавлялось размножение клостридий. Использованием для закваски молочнокислых бактерий значительно ускорялось снижение рН до уровня, неблагоприятного для развития клостридий, что, по-видимому, явилось одной из причин низкой активности споровых анаэробов в силосе с закваской и лучшего сбережения азота в нем.

Из лабораторных силосов были получены 44 накопительные культуры клостридий. Надо отметить, что все накопительные культуры, находившиеся в работе, отличались резким ослаблением роста в зимний период. В результате очистки из лабораторных силосов получено шесть чистых культур протеолитических анаэробов, пять из которых идентифицированы как *Cl. sporogenes* и одна как

Cl. acetobutylicum. Последний выделен из зрелого кукурузного силоса. Таким образом, и в лабораторных силосах анаэробная протеолитическая микрофлора представлена в основном видом *Cl. sporogenes*.

Изучавшиеся культуры отличались сильными протеолитическими свойствами: они гидролизовали 98,2—65,8 % белков молока за 4 сут. *Cl. sporogenes* и *Cl. subterminale* были способны к интенсивному гидролизу белков до аминокислот, в то время как *Cl. acetobutylicum* отличался слабым накоплением аминокислот в культуральной жидкости, но накапливал максимальное из приведенных количество пептидов.

Выводы

1. Численность протеолитических анаэробов в зрелых бобовых и злаковых производственных силосах колебалась в пределах $2 \cdot 10^2$ — $5 \cdot 10^5$ клеток на 1 г; в лабораторном силосе из клевера с закваской — от $1,3 \cdot 10^5$ в начале процесса до 30 на 45-е сутки, в лабораторном кукурузном — соответственно от $6,5 \cdot 10^4$ до 0, а в клеверном без закваски — от 0 до $1,3 \cdot 10^4$.

2. Численность клостридий в силосах прямо пропорциональна уровню активной кислотности в них.

3. Анаэробная протеолитическая микрофлора бобовых и злаковых силосов была представлена в основном видом *Cl. sporogenes*. Из кукурузного силоса выделен также *Cl. acetobutylicum*. Новым явилось выделение из горохо-овсяного силоса *Cl. subterminale*.

4. Культуры *Clostridium* различались по глубине протеолиза белков молока. *Cl. sporogenes* и *Cl. subterminale* интенсивно накапливали в культуральной жидкости аминокислоты, а *Cl. acetobutylicum* — пептиды.

ЛИТЕРАТУРА

1. Горова А. К. Протеолитические анаэробы рода *Clostridium* и их роль в трансформации белковых веществ в почве. Автореф. канд. дис. М., 1979. — 2. Гудков А. В. Биология споровых анаэробов, вызывающих порчу сыров. Автореф. канд. дис. Вологда, 1965. — 3. Гудков А. В., Михлин Э. Д., Полянин А. Н., Крашенин П. Ф. Приготовление и применение закваски для силосования кормов. — В сб.: Научные основы консервирования растительных кормов. М., Научный центр биологических исследований АН СССР в Пушкине, 1965, с. 39—49. — 4. Гудков А. В., Перфильев Г. Д. Определение возбудителей маслянокислого брожения в сырах. — Молочная промышленность, 1978, № 1, с. 15—18. — 5. Квасников Е. И., Щелокова И. Ф. Новое в микробиологии силосования кормов. — Изв. АН СССР, сер. биол., 1968, № 4, с. 543—555. — 6. Квасников Е. И., Нестеренко О. А. Молочнокислые бактерии и пути их использования. М.: Наука, 1975. — 7. Мищустин Е. Н., Емцев В. Т. Почвенные азотфиксирующие бактерии рода *Clostridium*. М.: Наука, 1974. — 8. Bergey D. H. Bergey's manual of determinative bacteriology. 8-th ed. Baltimore, 1974, p. 551—571. — 9. Neumark H. et al. — J. of Sci. Food. Agric., 1964, vol. 15, N 7, p. 487—490.

Статья поступила 29 октября 1979 г.

SUMMARY

The results of estimating the numbers, identification and characterization of proteolytic activity of cryptogamic anaerobes of *Clostridium* genus isolated from farm and laboratory silage are presented in the paper. It is found that proteolytic microflora of the silage is mainly represented by *Cl. sporogenes*, as well as by *Cl. acetobutylicum* and *Cl. subterminale*. Variation in the numbers of cryptogamic anaerobes with the level of active acidity in the silage is established. It is shown that all investigated cultures destroy proteins very intensively, but *Cl. acetobutylicum* causes not so deep hydrolysis of protein as *Cl. sporogenes* and *Cl. subterminale*.