

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ  
«ВИТЕБСКАЯ ОРДЕНА «ЗНАК ПОЧЕТА» ГОСУДАРСТВЕННАЯ  
АКАДЕМИЯ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ»

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ ДЛЯ  
ПРОИЗВОДСТВА ЗАКВАСОК, ПРИМЕНЯЕМЫХ ПРИ  
КОНСЕРВИРОВАНИИ КОРМОВ**

Учебно-методическое пособие для студентов обучающихся  
по специальности «Зоотехния», преподавателей и  
слушателей ФПКиПК

Витебск  
УО ВГАВМ  
2007

УДК 619:579: 636.085.52

ББК 48

А 16

**Авторы:**

С.В. Абраскова, кандидат с.-х. наук, ведущий научный сотрудник отдела полевого кормопроизводства РНИУП «Институт земледелия и селекции НАН Беларуси»;

А.А. Гласкович, кандидат ветеринарных наук, доцент УО ВГАВМ;

А.А. Вербицкий, кандидат ветеринарных наук, доцент УО ВГАВМ;

**Рецензенты:**

А.П.Медведев, доктор ветеринарных наук, профессор УО ВГАВМ;

Н.П.Разумовский, кандидат с.-х. наук, доцент кафедры кормления с.-х. животных им. В.Ф. Лемеша УО ВГАВМ;

Абраскова, С.В.

В 31 Использование молочнокислых бактерий для производства заквасок, применяемых при консервировании кормов: учебно-методическое пособие для студентов обучающихся по специальности «Зоотехния», преподавателей и слушателей ФНКИПК / С.В. Абраскова, А.А. Гласкович, А.А. Вербицкий. – Витебск: УО ВГАВМ. 2007. – 31 с.

ISBN 978-985-512-035-4

Учебно-методическое пособие предназначено для студентов по специальности «Зоотехния», преподавателей и слушателей ФНКИПК

Учебно-методическое пособие рассмотрено и одобрено на заседании методической комиссии зооинженерного факультета УО ВГАВМ.

Разрешено к печати редакционно-издательским советом УО «Витебская ордена "Знак Почета" государственная академия ветеринарной медицины» «11 октября 2007 г. (протокол № 3).

УДК 619:579:636.085.52

ББК 48

ISBN 978-985-6803-87-4



© С.В. Абраскова и др., 2007  
© УО «Витебская ордена "Знак почета" государственная академия ветеринарной медицины», 2007

## СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
Введение.....	4
1 Основные консервирующие факторы при заготовке силоса и сенажа.....	5
2. Влияние основных факторов внешней среды на жизнедеятельность молочнокислых бактерий.....	7
2.1. Влияние химического состава исходной растительной зеленой массы на ферментативную активность молочнокислых бактерий.....	7
2.2. Влияние кислотности среды на скорость кислотонакопления.....	9
2.3. Влияние температуры на энергию кислотообразования молочнокислых бактерий.....	10
2.4. Влияние аэрации на активность молочнокислых бактерий.....	11
2.5. Влияние повышенного осмотического давления среды на развитие молочнокислых бактерий.....	13
3. Биопрепараты на основе молочнокислых бактерий и их эффективность при консервировании кормов.....	14
4. Лабораторно-практические занятия по определению титра, ферментативных, антибиотических свойств молочнокислых бактерий, стабильности биопрепаратов.....	19
Занятия 1-2.....	19
Занятия 3-4.....	20
Занятия 5-6.....	22
Занятия 7-8.....	25
Занятия 9-11.....	26
5. Литература.....	29
6. Приложение.....	30

## ВВЕДЕНИЕ

Даже при благоприятных условиях естественного брожения при консервировании зеленых растений теряется немало питательных веществ. Ликвидация этих потерь равноценна повышению урожайности кормовых культур на 20-25%. Кроме того, обычный традиционный метод силосования непригоден для трав с высоким содержанием протеина (более 17% в сухом веществе). Согласно современным представлениям успех консервирования определяется суммарным действием основных консервирующих факторов: активной кислотностью, токсическим действием молекулы молочной кислоты и специфическими антибиотическими веществами молочнокислых бактерий. Молочнокислые бактерии полезны еще и тем, что являются продуцентами, помимо молочной кислоты и антибиотиков, других биологически активных веществ (витаминов, аминокислот и т.д.). Все это обуславливает поиск новых экологически чистых биопрепаратов на основе молочнокислых бактерий, регулирующих и направляющих микробиологический процесс по пути желательного гомоферментативного молочнокислого брожения.

Производственно-ценные штаммы молочнокислых бактерий должны обладать способностью активно размножаться, характеризоваться высокой энергией кислотообразования, т.е. образовывать большое количество молочной кислоты, достаточное для быстрого стабильного повышения кислотности консервируемого корма.

Проведенные исследования и их анализ позволяют заключить следующее. Биопрепараты независимо от формы (жидкой или сухой) должны обеспечить попадание на 1 грамм силосуемой массы не менее 100000 бактерий ( $10^2 \cdot 10^7$ ). В то же время имеются примеры использования биопрепаратов с крайне низким содержанием активных бактерий. В случае низкого количества жизнеспособных клеток молочнокислых микроорганизмов (менее  $10^5$ ) не может быть получен желаемый положительный эффект. Поэтому при разработке и выборе препаратов необходимо проведение строгого контроля титра, ферментативных свойств, стабильности биопрепаратов, предлагаемых в широком ассортименте на белорусском рынке.

Учебно-методическое пособие рассчитано на 4 часа лекций и 22 часа лабораторно-практических занятий.

## 1. Основные консервирующие факторы при заготовке силоса и сенажа

Молочнокислые бактерии – обширная группа микроорганизмов, отдельные свойства которых могут различаться довольно резко. Основным свойством молочнокислых бактерий, по которому их объединяют в определенную группу, является способность образовывать в качестве главного продукта брожения молочную кислоту. Накопление молочной кислоты молочнокислыми бактериями идет весьма энергично и в благоприятных условиях: каждая клетка за один час образует такое количество молочной кислоты, которое в 2-3 раза превосходит ее вес.

Ценность молочнокислых бактерий заключается в том, что сами они способны выдерживать высокие концентрации кислоты. Это объясняет тот факт, что молочнокислые бактерии составляют самую важную группу анаэробной микрофлоры силоса и сенажа. Установлено, что содержание 1% молочной кислоты резко снижает число бактерий, присутствующих в силосе.

В таблице 1 приведены некоторые данные, характеризующие отношение микроорганизмов, в том числе и молочнокислых бактерий, к реакции среды. Как видно, их развитие прекращается при значении pH около 3,0 – 3,5. Лучше всего молочнокислые бактерии размножаются при кислотности среды равной pH 6,0 – 7,0.

Таблица 1 - Отношение различных групп микроорганизмов к кислотности среды

Микробы	Примерный интервал развития	
	минимальное pH	максимальное pH
Гнилостные бактерии	Около 4,5 в	Около 8,5
Молочнокислые кокки	3,5	8,5
палочки	3,0	8,0
Маслянокислые бактерии	4,7	8,5
Группа кишечной палочки	4,5	8,0
Плесневые грибы	1,0	9,0
Дрожжи	3,0	7,0

Гнилостные и прочие нежелательные для силоса микроорганизмы не способны развиваться в среде, имеющей достаточно кислую реакцию. Исключение составляют лишь плесени и дрожжи; но они не могут жить без доступа воздуха, и хорошо изолированный корм не будет испорчен ими.

Следует отметить, что при подкислении корма в силу жизнедеятельности молочнокислых бактерий подавляется не только нежелательная микрофлора, но перестают также работать и ферменты растительной массы.

Комплекс дыхательных ферментов растений подавляется при pH около 3,0, а протеолитических – при pH около 4,0.

Консервирование зеленого корма с помощью молочной кислоты возможно лишь в том случае, когда ее содержание быстро повысится до уровня выше 1%. Важное значение имеет не только количество кислоты, а в какой форме она присутствует. Если, к примеру, молочная кислота в свободной форме составляет  $\frac{2}{3}$  (1-1,60%) от общего количества кислот (1,5-2,0%), силосованный корм будет характеризоваться высокими качественными показателями [10]. При этом заметное уменьшение численности видов микроорганизмов, портящих корм, происходит не только за счет активной кислотности, создаваемой молочной кислотой, но и за счет токсического действия самой молекулы (недиссоциированной части) кислоты.

Установлено, что существуют молочнокислые бактерии, вырабатывающие антибиотические вещества. Так, установлено, что молочнокислые палочки способны продуцировать вещества, угнетающие рост *Bact. coli* [5, 7].

Последние данные по исследованию антибиотической активности молочнокислых бактерий свидетельствуют о том, что они угнетают рост спорообразующих гнилостных и маслянокислых бактерий, неспороносных гнилостных, кишечной и дизентерийной палочки, золотистого стафилококка [6,7]. Угнетение роста происходило за счет выделения в среду специфических антибиотических веществ типа низина, диплокцина, лактобревина [7].

Таким образом, успех естественного силосования определяется тем, насколько интенсивно протекает молочнокислое брожение в начальной фазе по сравнению с другими нежелательными процессами брожения (гнилостное, маслянокислое и др.).

Принято считать, что биологической основой приготовления сенажа является ограничение дыхания растительных клеток и нежелательных микроорганизмов путем «физиологической сухости». Подробно этот аспект обсуждался ранее [8]. Здесь мы лишь подчеркнем, что у культур молочнокислых бактерий или провяленного силоса осмотическая активность, способность сбрасывать сложные углеводы (крахмал и др.), выше, чем у молочнокислых бактерий силоса [11]. Поэтому при создании оптимальных условий для их развития молочная кислота также активно образуется, но с некоторым смещением во времени. Об этом подробно рассматривается в главе 2.5.

## 2. Влияние основных факторов внешней среды на жизнедеятельность молочнокислых бактерий.

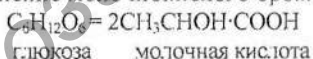
### 2.1. Влияние химического состава исходной растительной зеленой массы на ферментативную активность молочнокислых бактерий

Интенсивность образования молочной кислоты, образуемой молочнокислыми бактериями, зависит от количественного соотношения микроорганизмов и химического состава растительной массы.

В большинстве случаев естественного наличия молочнокислых бактерий недостаточно для достижения быстрого повышения кислотности силосуемой массы. Исключением является кукуруза и другое исходное сырье, богатое свободными сахарами. Особенностью брожения при силосовании такой зеленой массы является то, что уже на 2-3 сутки наблюдается численный перевес молочнокислых бактерий, которые к 12 дню составляют всю массу существующих в силосе бактерий. Это обусловлено обеспеченностью этих культур моно- и дисахаридами, которые наиболее подходят для питания и существования молочнокислых бактерий. При соблюдении всех технологических приемов в результате быстрых биохимических превращений в начальный период хранения силос из кукурузы (как в чистом виде, так и с добавлением соломы) полностью созревает на 15 сутки с момента закладки.

Многие моносахариды (глюкоза, левулеза, галактоза, манноза) сбраживаются, как правило, всеми молочнокислыми бактериями.

Общее уравнение молочнокислого брожения



является суммарным, подытоживающим ряд сложных превращений углеводов и продуктов их распада, поэтапно совершающихся в микробной клетке.

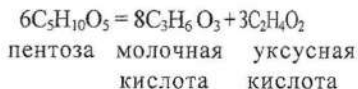
Определенные виды молочнокислых бактерий обладают способностью использовать пентозы (ксилозу, арабинозу) и, в частности, рамнозу (метилпентозу).

Дисахариды — (сахароза, мальтоза, лактоза) ассимилируются обычно избирательно. Некоторые виды молочнокислых бактерий сбраживают одни углеводы, а другие — иные. В природе встречаются, впрочем, молочнокислые бактерии, могущие усваивать и сбраживать довольно широкий набор дисахаридов.

Полисахариды (декстрины, крахмал, инулин) могут сбраживаться лишь единичными, недавно описанными формами молочнокислых бактерий. В растительной массе имеются полисахариды левулезаны, играющие роль резервных веществ. Они относительно легко гидролизуются и, по имеющимся

предварительным данным, по всей видимости, сбраживаются некоторыми молочнокислыми бактериями. Клетчатка молочнокислыми бактериями не используется. Ее запас в силосуемой массе остается неизменным.

Достаточно сильно меняется состав конечных продуктов брожения в том случае, если сбраживается не гексоза, а пентоза, т. е. сахар с пятью атомами углерода: образуются продукты брожения с двумя и тремя атомами углерода (молочная и уксусная кислоты). В таком случае процесс брожения может быть выражен следующим примерным уравнением:



В растительном сырье содержатся пентозаны, дающие при гидролизе пентозы. Поэтому неудивительно, что даже при нормально идущем созревании силоса в нем обычно накапливается некоторое количество уксусной кислоты.

По составу продуктов брожения, молочнокислые бактерии в настоящее время делят на две основные группы:

1. Гомоферментативных – образующих из сахаров кроме молочной кислоты лишь следы побочных продуктов.

2. Гетероферментативных – образующих из сахаров помимо молочной кислоты, заметные количества углекислого газа и других продуктов.

Известную биохимическую характеристику вышеуказанным группам молочнокислых бактерий дает табл.2, в которой указаны накапливающиеся основные продукты их жизнедеятельности. Как видно, гомоферментативные молочнокислые бактерии, в отличие от гетероферментативных, образуют весьма небольшие количества летучей кислоты (уксусной), спирта и углекислого газа. Потери энергии при сбраживании глюкозы гомоферментативными молочнокислыми бактериями – 2-3%, а выход молочной кислоты составляет 95-97%.

Таблица 2 - Продукты брожения молочнокислых бактерий, образуемых из углеводов

Бактерии	Процент сахара, превращенного в			
	молочную кислоту	уксусную кислоту	этиловый спирт	углекислый газ
Гомоферментативные:				
кокковидные	86,0 – 90,0	3,5 – 7,0	0,7 – 1,5	2,0 – 5,5
палочковидные	68,0 – 88,0	3,8 – 7,0	1,0	1,0 – 6,0
Гетероферментативные:				
кокковидные	26,0 – 50,0	4,4 – 14,0	10,0 – 21,0	17,0 – 30,0
палочковидные	35,0 – 37,0	10,0 – 16,0	12,0 – 15,0	25,0

На интенсивность образования молочной кислоты, образуемой молочнокислыми бактериями, заметное влияние может оказывать не только состав среды (химический состав растительной массы, закладываемой на силос, сенаж), но и другие условия (кислотность среды, температура, аэрация и т.д.).

## **2.2. Влияние кислотности среды на скорость кислотонакопления**

При разных значениях pH промежуточные реакции, имеющие место при брожении, получают разное направление. Если образующаяся молочная кислота будет нейтрализоваться, то при развитии гомоферментативных молочнокислых бактерий на гексозах будут накапливаться значительные количества уксусной кислоты и других побочных продуктов (до 40% от сброженного сахара).

Результаты многих исследователей показали снижение молочной кислоты в силосе с увеличением pH. Так в группе образцов, имевших pH выше 5,0 наблюдалось низкое содержание молочной кислоты, а ее соотношение с уксусной составляло 1:1 [10].

В силу того, что молочнокислые бактерии вырабатывают в результате своей жизнедеятельности значительное количество кислот, они развиваются при довольно низком значении pH (табл. I).

В группу молочнокислых бактерий входят как кокковидные, так и палочковидные формы. Последние переносят более низкую кислотность. Этим свойством молочнокислых палочек объясняется факт их накопления к концу силосования, когда корм значительно подкисляется.

В таблице 1 приведены некоторые данные, отношения микроорганизмов, в том числе и молочнокислых бактерий, к реакции среды. Как видно, их развитие прекращается при значении pH около 3,0 – 3,5.

Сопоставление материалов различных исследователей показывает, что для одних и тех же форм молочнокислых бактерий указываются не тождественные величины критического значения pH. В этом нет ничего удивительного, так как на положении кардинальных точек pH сказываются состав кислот, определяющих реакцию среды, а также компоненты того субстрата, в котором развиваются бактерии. Поэтому, например, минимальные точки pH для какой-нибудь бактерии будут не одинаковы в двух различных средах. Так, менее диссоциированная, но более вредная для микроорганизмов уксусная кислота приостанавливает развитие молочнокислых бактерий при более высоком значении pH, чем молочная.

### 2.3. Влияние температуры на энергию кислотообразования молочнокислых бактерий

Жизнедеятельность молочнокислых бактерий может успешно протекать как в относительно холодных, так и в самонагревающихся силосах.

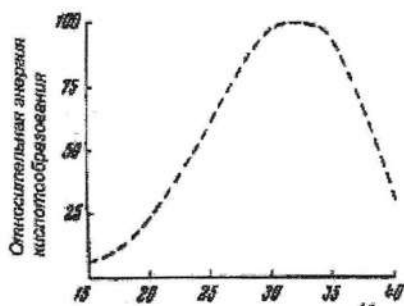


Рис. 1 Влияние температуры на энергию кислотообразования молочнокислой бактерии

Отдельные виды и расы молочнокислых бактерий могут развиваться при довольно различных температурных условиях. Наиболее обычные представители их живут в пределах от 7 — 10 до 42 — 47°, имея оптимум около 25-30°. На рисунке 1 дается показатель жизнедеятельности одной из рас молочнокислых бактерий, довольно часто встречающихся в силосуемых кормах, — энергия кислотообразования при разных температурах на [3].

В природе, однако, нередки формы молочнокислых бактерий, способных размножаться как в зоне более высоких, так и низких температур. Например, в силосах, созревших зимой при весьма низкой плюсовой температуре, встречаются стрептококки с минимальной температурной точкой ниже 5°. Их оптимум лежит около 25°, а максимум около 47°. При 5° эти бактерии еще довольно энергично накапливают в корме молочную кислоту.

При пониженных температурах могут развиваться не только кокковидные, но и палочковидные формы молочнокислых бактерий.

В самонагревающихся силосах также удавалось находить, наряду с молочнокислыми палочками, и кокки. Минимальная температурная точка кокков, способных развиваться при повышенных температурах, около 12°, палочек — около 27°. Температурный максимум этих форм приближался к 55°, а оптимум лежит в интервале 40 — 43°.

Молочнокислые бактерии развиваются плохо в экстремальных условиях — выше 55°, а при дальнейшем повышении температуры погибают, как формы не образующие спор. О характере влияния разных температур на накопление молочной кислоты в силосе из злаковых трав показано на рисунке 2. Как видно, при 60° накопление молочной кислоты сильно подавляется.

Отдельные исследователи отмечают, что молочная кислота накапливается в силосах при их разогревании даже выше 60 — 65°. В связи с этим следует иметь в виду, что она может продуцироваться не только молочнокислыми бактериями.

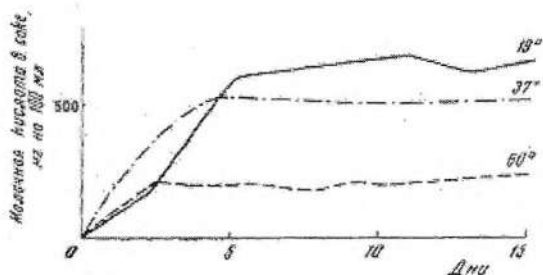


Рис. 2. Влияние температуры на накопление кислоты в силосе из травы

Молочную кислоту в некотором количестве вырабатывают и другие бактерии. В частности, она образуется и среде при развитии некоторых спороносных палочек, принадлежащих к группе *Bac. subtilis* и размножающихся при повышенной температуре. Подобные формы всегда бывают богато представлены в самосогревающихся силосах.

#### 2.4. Влияние азрации на активность молочнокислых бактерий

Молочнокислые бактерии являются условными факультативными анаэробами, т.е. могут жить как в присутствии кислорода, так и в анаэробных условиях. Степень обеспеченности среды кислородом может быть охарактеризована величиной окислительно-восстановительного (ОВ) потенциала (Eh). Иногда ОВ потенциал выражается величиной  $rH_2$ , вычисляемой по формуле:

$$rH_2 = \frac{Eh \text{ (в милливольтях)}}{29} + 2pH$$

Величина  $rH_2$  показывает отрицательный логарифм концентрации молекул водорода, выраженный в атмосферах. Совершенно очевидно, что степень обеспеченности кислородом непосредственно связана с концентрацией в среде молекул водорода, показывающих степень ее насыщенности.

В кислородной среде, при нейтральной ее реакции, величина Eh равна 810, а  $rH_2 = 41$ . В атмосфере водорода, соответственно, Eh = - 421, а  $rH_2 = 0$ . Колебания отмеченных величин характеризуют ту или иную степень

аэробности. В среде, где развиваются молочнокислые бактерии, потенциал может снижаться довольно низко, до значения  $\text{rH}_2$  5,0—6,0.

Таким образом, молочнокислые бактерии не нуждаются в кислороде. Они настолько приспособились к получению необходимой энергии с помощью броуильного процесса, что даже при доступе воздуха не переходят на дыхание и продолжают вызывать броуильный процесс. Это объясняется отсутствием у молочнокислых бактерий системы ферментов, обеспечивающей дыхание (гемин-фермент, каталаза и т. д.). Правда, имеются отдельные факты, свидетельствующие о способности некоторых возбудителей молочнокислого процесса существовать в аэробных условиях за счет дыхания. Возможно, что подобные формы бактерий встречаются, но они представляют исключение.

В литературе имеются данные об окислении отдельными молочнокислыми бактериями молочной кислоты в аэробных условиях. Благодаря этому в культурах подобных микроорганизмов кислотность со временем падает. Соображения такого рода вряд ли основательны.

В плотно заложенном силосуемом корме молочнокислые бактерии могут интенсивно размножаться, в то время как подавляющее большинство гнилостных бактерий и плесени испытывают явную депрессию.

Если к силосуемой массе имеется доступ кислорода, то молочная кислота разрушается дрожжами, плесенями и др. аэробными бактериями. В таком случае кислотность силоса падает, в нем начинают развиваться гнилостные процессы и корм портится [1,8,9].

На рисунке 3 видно, что аэробные условия способствовали разложению молочной кислоты в силосе из кормовой капусты [3]. Этот корм был испорчен, так как консервирующий фактор - молочная кислота - перестал действовать на нежелательную микрофлору, которая сохранилась в пассивном состоянии в кормовой массе.

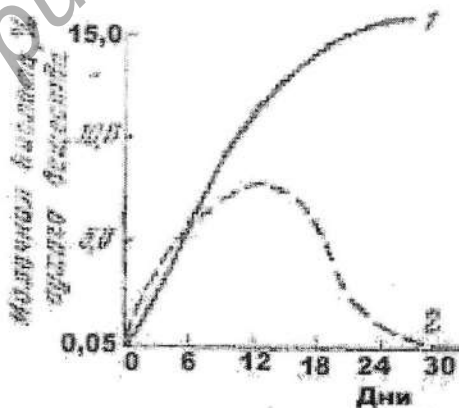


Рис. 3. Влияние доступа воздуха на содержание молочной кислоты в силосе:

- 1 — анаэробные условия;
- 2 — аэробные условия.

## *2.5. Влияние повышенного осмотического давления среды на развитие молочнокислых бактерий*

Информация относительно устойчивости молочнокислых бактерий к повышенному осмотическому давлению среды ограничена. Из имеющихся сведений следует, что различные виды этих микроорганизмов по-разному относятся к присутствию хлористого натрия в среде, в т.ч. иногда наблюдается адаптация к высоким концентрациям соли [7].

Детальные исследования физиологии молочнокислых бактерий, выполненные под руководством Мишустина Е.Н., убедительно показали слабую приспособленность эпифитных молочнокислых бактерий к брожению на среде с высоким осмотическим давлением в растительных клетках [6]. Более поздними исследованиями установлено, что культуры молочнокислых бактерий сенажа более осмофильны, чем культуры выделенные из силоса. Они выдерживали концентрацию хлористого натрия от 7 до 10%, в то время как силосные молочнокислые бактерии – до 7%. При этом уже при 6% содержания соли в среде начинает изменяться морфология клеток: удлиняется форма, наблюдается вздутие на концах клетки, искривления по центру и по периферии, нарушаются некоторые их жизненно важные функции. Это происходит из-за обезвоживания и затруднения потребления питательных веществ клетками из окружающей среды [7].

Примерно в такие же условия микроорганизмы попадают в процессе заготовки сенажа. Культуры молочнокислых бактерий сенажа, приспособившись к высокой осмотической активности клеточного сока (50 атм. при 40-45% влажности травы), обладают более высокой способностью к выживанию, чем молочнокислые бактерии силоса, гнилостные микроорганизмы, дрожжи.

Таким образом, осмотическая активность культур молочнокислых бактерий сенажа является фактором, обеспечивающим доминирующее положение их при приготовлении и дальнейшем хранении кормов с пониженной влажностью. Если влажность консервированной массы будет ниже 50-60 %, то она хорошо сохранится даже при дефиците водорастворимых углеводов.

У культур молочнокислых бактерий сенажа и силоса различается не только осмотическая активность, но активность размножения и накопление молочной кислоты, а также способность сбраживать крахмал, арабинозу, ксилозу. Максимальное количество микроорганизмов в вариантах с подвяленной массой выявилось на 15 сутки, в то время как в вариантах силоса из свежескошенных растений – на 7 сутки [11].

Однако в производственных условиях непросто достичь высокого содержания сухого вещества в скошенной траве из-за погодных условий. Поэтому в течение ряда лет учеными велись поиски биопрепаратов, которые могли бы положительно повлиять на качество консервируемых кормов из свежескошенных и провяленных трав. При силосовании провяленных трав должны применяться только особые осмоотолерантные молочнокислые бактерии.

### *3. Биопрепараты на основе молочнокислых бактерий и их эффективность при консервировании кормов.*

Обычный традиционный метод силосования непригоден для трав с высоким содержанием протеина (более 17% в сухом веществе). В таком силосе высокое содержание летучих жирных кислот, в т.ч. значительное количество масляной кислоты, низкая протеиновая и энергетическая питательность сухого вещества [1, 4, 8, 10, 13]. В решении вопроса повышения сохранности, качества и продуктивного действия консервированных кормов все более важное место отводится экологически чистым биопрепаратам на основе молочнокислых бактерий. Консервирование с использованием заквасок основано на искусственном увеличении численности молочнокислых бактерий, выделенных из растительной массы с целью более быстрого подкисления корма до оптимального значения.

Как отмечалось выше (глава 1) основными консервирующими факторами являются активная кислотность, токсическое действие самой молекулы молочной кислоты, и специфические антибиотические вещества молочнокислых бактерий.

Немаловажным фактором является то, что молочнокислые бактерии обогащают силосуемый корм некоторыми витаминами, например, В<sub>1</sub>, С и т.д. Кроме того, некоторые молочнокислые бактерии, нуждаясь в одном факторе роста, в то же время обогащают среду, в которой они развиваются, другими ростовыми веществами. В некоторых случаях из отдельных фрагментов молекул ростовых веществ микроорганизмы синтезируют полные частицы необходимых им соединений.

В связи с вышеизложенным неудивительно, что постоянно ведется поиск новых биопрепаратов, регулирующих и стимулирующих микробиологические процессы в нужном направлении при консервировании кормов.

Молочнокислые бактерии, используемые для приготовления заквасок, должны отвечать следующим требованиям:

- быть энергичными кислотообразователями, т.е. производить преимущественно молочную кислоту из доступных водорастворимых углеводов.
- не утилизировать органические кислоты
- быть устойчивыми к кислой среде (при pH 4,0)
- обладать способностью к росту при температуре до 50°
- быть достаточно осмотолерантными

В последние годы достигнут значительный прогресс в решении данного вопроса, предложен ряд заквасок отечественного Силлактим, Лаксил, Амилонитробактерин и зарубежного производства Био-Сил, Бонсилаге, Лабосил, Биотроф, Лактофлор и др. [4, 12, 15]. Особой популярностью пользуются новые препараты, созданные на основе гомоферментативных

осмотолерантных штаммов молочнокислых бактерий, способных успешно развиваться в провяленной массе [11, 14].

Большая часть биопрепаратов содержит по крайней мере, один или два вида молочнокислых бактерий: *Streptococcus*, действующего как затравка для быстрого понижения pH до 5,0 и *Lactobacillus*, которая увеличивает кислотность до стабильного значения (pH 3,9 – 4,2).

Для улучшения процесса брожения при силосовании растительной массы разработаны биопрепарат Силлактим на основе культуры молочнокислых бактерий *Lactobacillus plantarum* с использованием жидкой питательной среды и Лаксил – комплексный биологический консервант (Беларусь). В состав входят два штамма молочнокислых бактерий, обладающих высокой энергией кислотонакопления, антагонистическими свойствами по отношению к микроорганизмам, вызывающим порчу корма. Установлено, что Силлактим и Лаксил обеспечивают хорошую сохранность корма с минимальными потерями основных питательных веществ, обогащают силос биологически активными веществами, позволяют повысить продуктивность животных, не оказывают отрицательного действия на организм животных и окружающую среду, значительно удешевляют процесс приготовления силосованного корма [4].

Лабоксил, Бонсилаге и Био-Сил препараты, созданные в Германии, для создания оптимальных условий силосования травяных кормов. Лабоксил – специально подобранная смесь штаммов гомоферментативных молочнокислых микроорганизмов (*Enterococcus faecium*, *Pediosoccus acidilactici*, *Lactobacillus plantarum*) для консервирования культур с низким содержанием сухого вещества. Действие препарата основано на том, что *Enterococcus* ферментирует углеводы уже в первые 3-5 часов и снижает кислотность силосуемого сырья до уровня 5,4. Затем штамм *Pediosoccus*, обладая высоким кислотонакоплением до pH 4,5 – 4,0, сам прекращает активность при таком pH, а штамм *Lactobacillus* продолжает некоторое время поддерживать оптимальный уровень кислотности для силосования.

Основным преимуществом при применении Био-Сила и Бонсилаге, которые содержат специально подобранные штаммы гомоферментативных молочнокислых бактерий, также заключается в быстром снижении показателя pH (стабильный pH достигается уже через 1-2 дня) (рис.4, 5).

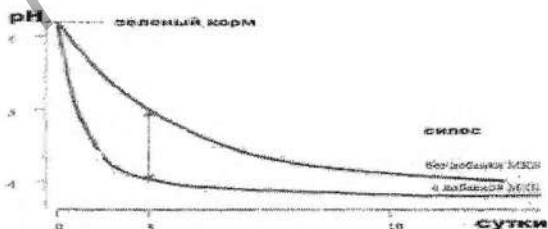


Рис.4. Ход снижения pH в силосном штабеле с добавкой Био-Сил и без

В таких условиях другие виды нежелательных бактерий, в т.ч. маслянокислые бактерии (*Clostridium* sp.), не имеют шанса повлиять на процесс силосования, т.е. становятся управляемыми процессы брожения (табл. 3).

Таблица 3 – Влияние Бонсилаге на развитие кластридий в силосе (сухое вещество 23%)

Показатели	Необработанный силос	Обработанный силос
Уровень pH	6,0	4,9
Количество молочной кислоты, %	0,05	1,1
Количество колоний кластридий	100	7

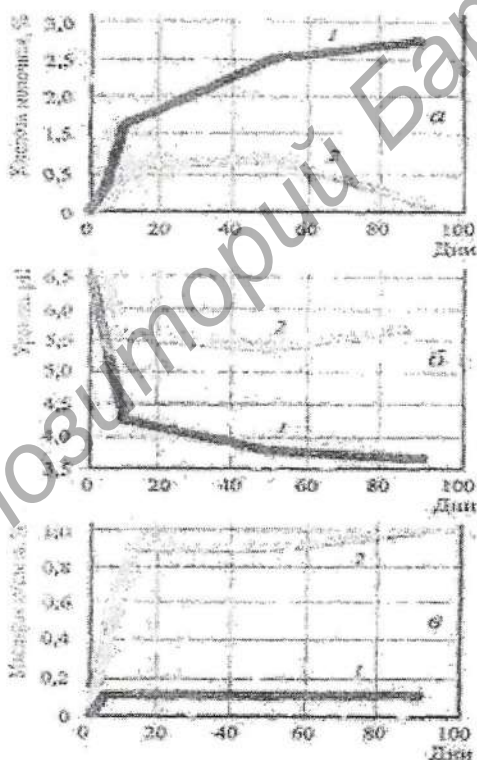


Рис. 5. Интенсивность образования молочной кислоты (а), снижение pH и стабильный уровень pH (б) и содержание масляной кислоты (в);

1- Бонсилаге; 2 - необработанный силос

Кроме того, важным моментом является то, что обработка Бонсилаге предотвращает размножение вредных бактерий (в т.ч. клостридий и плесневых грибов) при доставке силоса из траншеи в кормушку (аэробная стабильность силоса), что гарантирует снижение потерь и отличное качество силоса [15].

Особенно эффективно применение Бонсилаге при силосовании люцерны (содержание сухого вещества 35-48%), которую относят к трудносилосуемым растениям. Био-Сил рекомендуют применять при силосовании растительной массы с содержанием сухого вещества до 30%, а также от 35 до 50%, но с достаточным количеством углеводов (злаковые травы, кукуруза).

Биопрепараты типа Биотроф, Лактофлор (Россия) на основе особых осмофилантных штаммов молочнокислых бактерий находят все большее распространение в сельскохозяйственной практике. По надежности и консервирующему действию Биотроф не уступает признанному в мировой практике аналогу – Кофасил-Лак. При силосовании проявленных злаково-клеверных смесей, а также бобовых (кроме люцерны) Биотроф обеспечивает быстрое подкисление корма до pH 4,3 и ниже, сокращение питательных веществ в 2,0-2,5 раза.

Сущность силосования с применением “Лактофлор силосный” заключается в искусственном обогащении силосуемого материала молочнокислыми бактериями *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus lactis*, выделенных из силоса высокого качества.

Данные микроорганизмы являются представителями нормальной эпифитной микрофлоры и обитают на поверхности растений и на разлагающихся растительных остатках. Это грамположительные бактерии, не образующие спор и представляющие собой неподвижные длинные палочки. *Lactobacillus plantarum* осуществляют гомоферментативное молочнокислое брожение, т.е. они образуют практически только одну молочную кислоту, которая составляет не менее 90% всех продуктов брожения. За счет этого они снижают pH до значения меньше 5 и, тем самым, подавляют рост других бактерий, которые не способны развиваться в кислой среде.

Внесение препарата Лактофлор в растительное сырье приводит к быстрому накоплению молочной кислоты и подавлению гнилостной микрофлоры в первые же дни силосования. Это исключает протекание маслянокислого брожения, которое наблюдается при силосовании сырья, богатого белком или недостаточно уплотненного.

Силос, полученный с использованием Лактофлора, отличается от необработанного более высоким содержанием питательных веществ и отличными органолептическими характеристиками, поэтому значительно лучше поедается животными и положительно влияет на их продуктивность.

Таким образом, использование биопрепаратов на основе молочнокислых бактерий при консервировании обеспечивает:

1. улучшение процесса брожения – быстрое снижение уровня pH и оптимальное соотношение органических кислот.
2. улучшение органолептических показателей корма и сохранность корма с минимальными потерями основных питательных веществ (протеина и сахара)
3. обогащение корма биологически активными веществами (витаминами, аминокислотами)
4. повышение аэробной стабильности консервированных кормов
5. повышение переваримости и усвояемости питательных веществ – на 2-8%
6. повышение продуктивности животных – удоев молока до 1 л в сутки и прироста живой массы – 100 – 108 г
7. не оказывает отрицательного действия на организм животного и окружающую среду
8. удешевляет процесс в 2-3 раза по сравнению с применяемыми химическими консервантами.

Проведенные исследования позволяют заключить, что независимо от формы препарата (жидкая или сухая) он должен обеспечить попадание в силосуемую массу не менее 100000 бактерий на 1 грамм (т.е.  $10^5 - 10^7$ ) [15].

В случае низкого титра микроорганизмов не может быть получен желаемый положительный эффект. В связи с этим необходимы проведение анализов титра, ферментативных свойств, стабильности биопрепаратов, предлагаемых для использования при консервировании кормов.

#### 4. Лабораторно-практические занятия по определению титра, ферментативных, антибиотических свойств молочнокислых бактерий, стабильности биопрепаратов

##### Занятие 1 – 2

Тема занятия: Характеристика и порядок поддержания исходной культуры молочнокислых бактерий для изготовления заквасок.

Цель занятия: Определение чистоты культуры молочнокислых бактерий и интенсивности роста молочнокислых бактерий при разной кислотности среды.

Время: 4 часа

Оборудование и материалы:

- 1) 2 пробирки с МПА (скошенный).
- 2) 2 пробирки с суслон (жидкая среда).
- 3) предметные и покровные стекла, красители
- 4) шпатели, бак. петли
- 5) микроскоп
- 6) чистые культуры молочнокислых бактерий на МПА (1 пробирка), на сусле (1 пробирка)

Методические указания: Преподаватель поясняет, что культуры, рекомендованные для силосной закваски, должны контролироваться по чистоте и активности кислотообразования. Чистая культура молочнокислых бактерий – это беспоровые палочки, расположенные одиночно, попарно и в цепочках. Встречаются также круглые и овальные. (Приложение 1-2). Тонкий, полупрозрачный налет на косячке МПА свидетельствует о чистоте культуры, обильный рост по штриху – загрязнение и непригодность культуры к использованию.

**Занятие 1.** Чтобы определить чистоту культуры проводят посев петлей в пробирки со скошенным агаром. Для определения активности по кислотообразованию проводят посев в пробирки с суслон. Засеянные пробирки помещают в термостат при  $25^{\circ} - 30^{\circ}$  на 2 суток.

**Занятие 2.** Делают визуальный учет роста по штриху и налет подвергают микроскопированию как в живом, так и в фиксированном (окрашенном метиловой синью) виде. Для определения активности по кислотообразованию к 5 – 10 мл двухсуточной культуры, выросшей на сусле, добавляют 25 – 30 мл дистиллированной воды и титруют децинормальным раствором NaOH (0,1N NaOH) в присутствии фенолфталеина. Кислотность суслон за этот срок культивирования должна быть не ниже  $30^{\circ}$  по Тернеру (что соответствует 30 мл децинормальной NaOH), пошедшей на титрование.

Самостоятельная работа студентов

**Занятие 1.** Студенты проводят посев в 2 пробирки со скошенным МПА и в 2 пробирки с суслимом культуры молочнокислых бактерий.

**Занятие 2.**

1). Студенты делают мазки со скошенного МПА, окрашивают простым методом с использованием метиленовой синь. Микроскопируют, зарисовывают в тетрадь и определяют морфологию молочнокислых бактерий.

2). Для определения кислотонакопления студенты проводят титрование 0,1N NaOH культуральной жидкости (суслима).

Контрольные вопросы:

1. Каким требованиям должны отвечать молочнокислые бактерии, используемые для производства биопрепаратов.
2. Что является показателем чистоты культуры молочнокислых бактерий.
3. На каких питательных средах проверяется активность молочнокислых бактерий по кислотообразованию.
4. На каких питательных средах проверяется чистота культур молочнокислых бактерий.

Домашнее задание

Количественный учет анаэробных молочнокислых бактерий.

Литература:

[2] [3] [6]

### Занятие 3 – 4

Тема занятий

Количественный учет анаэробных молочнокислых бактерий.

Цель занятия:

Определение титра клеток молочнокислых бактерий (чашечный метод Коха).

Время:

4 часа

Место работы:

лаборатория кафедры микробиологии и вирусологии

Оборудование и материалы:

- 1). 10 пробирок со стерильной водопроводной водой по 9 мл (или 0,85% NaCl);
- 2). 10 стерильных пипеток, градуированных по 1 мл;
- 3). 30 чашек Петри с МПА агаром.
- 4). Готовая чистая закваска на основе молочнокислых бактерий;
- 5). Лупа x 2-3 раза;

Методические указания:

Преподаватель поясняет, что существует несколько методов количественного учета микроорганизмов, (в т. ч. чашечный метод Коха). Определение титра молочнокислых бактерий важно, чтобы исключить риск для потребителя. К примеру, при выборе или покупке того или иного биопрепарата,

независимо от его формы (жидкой или сухой), он должен обеспечить попадание на 1 г силосуемой массы не менее 100000 активных бактерий ( $10^5$ ).

**Занятие 3.** Для получения изолированных колоний и их учета необходимо приготовить ряд последовательных разведений в стерильной водопроводной воде (или 0,85% NaCl). 1 мл исследуемой суспензии (готовая чистая закваска) переносят в пробирку с 9 мл стерильной воды – 1-е разведение ( $10^1$ ). Полученное разведение тщательно перемешивают новой стерильной пипеткой, вбирая в пипетку и выпуская из нее полученную взвесь (3-5 раз), отбирают 1 мл полученной суспензии и переносят во 2-ю пробирку (разведение  $10^2$ ). Таким же образом готовят последующие разведения. Степень разведения зависит от плотности исследуемой популяции микроорганизмов из исследуемой закваски.

Для проведения посева на плотную среду точно измеренный объем (0,1; 0,5; 1 мл) разведения вносят в расплавленный и остуженный до 48-50 ° мясопептонный агар, тщательно перемешивают и затем выливают в чашку Петри (пробирки). Когда среда застынет, чашки Петри переворачивают верх дном и помещают в термостат на 3-5 суток при  $t$  25-32°.

#### **Занятие 4.**

Для подсчета выросших колоний визуально просмотреть чашки Петри с разведениями. Если число выросших колоний оказалось меньше 10, результаты не используют для расчета количества клеток в исходном материале. Лучшим разведением следует считать то, при высеве из которого на МПА агаре в чашке Петри вырастает от 30-50 до 100-150 колоний. Результаты параллельных высевов из одного и того же разведения суммируют и определяют среднее число колоний, выросших при высеве из данного разведения по одной чашке. Количество клеток в 1 мл исследуемого биопрепарата вычисляют по формуле:

$$M = \frac{a \cdot 10^n}{V}, \quad \text{где}$$

M – количество клеток в 1 мл,

a – среднее число колоний при высеве данного разведения

10 – коэффициент разведения

n – порядковый номер разведения, из которого сделан высеv

V – объем суспензии, взятой для посева, в мл (0,1; 0,5; 1,0 мл)

Самостоятельная работа студентов	3.1. Студенты готовят ряд последовательных разведений культуры молочнокислых бактерий в стерильной водопроводной воде (или 0,85% NaCl) и проводят посев в чашки Петри с МПА. 3.2. Проводят учет и подсчет колоний, записывают в тетрадь результаты подсчета
Контрольные вопросы	1. Какие существуют методы количественного учета микроорганизмов? 2. Чем вызвана необходимость определения титра бактерий в заквасках, используемых для консервирования кормов? 3. Какой оптимальный титр микробных клеток должен быть для получения желаемого эффекта от применения биопрепарата?
Подведение итогов занятия	Выставление оценок по теоретической части, прием выполнения практической части, изложение замечаний.
Домашнее задание	Изучение ферментативных свойств молочнокислых бактерий
Литература	[2] [3] [13]

### Занятие 5 – 6

Тема занятия:	Изучение ферментативных свойств молочнокислых бактерий
Цель занятий:	Определение способности брожения и амилолитической активности молочнокислых бактерий.
Время	4 часа
Место работы:	Лаборатория кафедры микробиологии и вирусологии
Оборудование и материалы:	1). 8 пробирок с пептонной средой (глюкозой, лактозой, сахарозой, мальтозой – по 2 пробирки 2). Среды для выявления амилолитической активности в чашках Петри (2 чашки) 3). Культура молочнокислых бактерий на скошенном МПА (2 пробирки) 4). Оборудованное место бактериолога (....., спиртовки, раствор Люголя) 5). Миллиметровая бумага (или линейка)
Методические указания	Преподаватель дает краткую характеристику молочнокислым бактериям и конечным продуктам брожения. Объясняет, что крахмал подвергается гидролитическому расщеплению под действием амилаз, которые имеются у некоторых представителей молочнокислых бактерий. Гомоферментативные молочнокислые бактерии используют простые водорастворимые углеводы для энергетического и

конструктивного метаболизма, а гетероферментативные – только для энергетического метаболизма. При сбраживании углеводов гомоферментативными молочнокислыми бактериями потери энергии минимальны – 2-3%. Под аэробной стабильностью консервированных кормов следует понимать корм, не подвергающийся аэробной порче при вскрытии хранилища и скармливании его животным.

**Занятие 5.** Для выявления амилолитической активности используют среду следующего состава (г/л): пептон – 10,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 5,0; растворимый крахмал – 2,0; агар – 15,0; pH среды – 6,8 – 7,0. Среду стерилизуют при 1 атм и разливают в стерильные чашки Петри. Когда среда застынет, исследуемые бактерии высевают штрихом по диаметру чашки или уколом. Продолжительность культивирования 2-10 суток.

*Методика выявления ферментативной активности.* Способность к сбраживанию углеводов (моносахаридов, дисахаридов) проверяют на углеводно-пептонной среде с относительно высокой концентрацией углеводов и небольшим количеством пептона. Состав среды: углевод – 10,0; пептон – 2,0;  $\text{NaCl}$  – 5,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,3; агар – 0,3. На 100 мл среды добавляют 0,3 мл 1%-ного водного раствора бромтимолового синего, pH среды 7,1 – 7,2. Среду без углевода стерилизуют при 1 атм. Углеводы (глюкозу, сахарозу, лактозу, мальтозу) добавляют к стерильной расплавленной среде в виде растворов в дистиллированной воде, которые стерилизуют при 0,5 атм. Стерильную среду с углеводами разливают в стерильные пробирки слоем 5 – 6 см и после того, как среда застынет, ее засевают исследуемой культурой. Посев делают уколом. Для каждого углевода используют две пробирки. После посева поверхность среды в одной пробирке заливают стерильным расплавленным парафином, или смесью вазелинового масла и парафина (1:1), или водным агаром (1,5 г агара на 100 мл) слоем 1 – 2 см. Продолжительность культивирования от 2 до 7 суток.

*Методика выявления амилолитической активности, т.е. способность гидролизовать (расщеплять) крахмал.* С этой целью используют среду следующего состава (г/л): пептон – 10,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 5,0; растворимый крахмал – 2,0; агар – 15,0; pH среды – 6,8 – 7,0. Среду при 1 атм и разливают в стерильные чашки Петри. Когда среда застынет, исследуемые бактерии высевают штрихом по диаметру чашки или уколом. Продолжительность культивирования 2 – 10 суток при  $t$  25-32°.

### **Занятие 6.**

По окончании культивирования регистрируют изменение pH среды по перемене цвета индикатора. Микроорганизмы, способные сбраживать углеводы (моносахариды и дисахариды) образуют кислоту в обеих пробирках, но кислотность в анаэробных условиях значительно выше, чем в первом варианте, что хорошо заметно по изменению цвета индикатора. Если брожение сопровождается образованием газов (по типу гомоферментативного молочнокислого брожения), то происходит разрыв среды.

Гидролиз крахмала обнаруживают после обработки агаризованной пластинки раствором Люголя – наливают 3 – 5 мл раствора на поверхность среды. Среда, содержащая крахмал, окрашивается в синий цвет. Зона гидролиза остается бесцветной или приобретает красно-бурую окраску, если крахмал гидролизовался до декстринов. Зону гидролиза крахмала измеряют в мм от края штриха (колонии) до границы светлой зоны. Чем больше диаметр светлой зоны, тем выше амилолитическая активность.

Результаты наблюдений сравнивают с показателями роста в контрольной среде, не содержащей источника углерода.

### **Занятие 5.**

1). Студенты проводят посев культуры молочнокислых бактерий на углеводно-пептонную среду (по 2 пробирки на каждый углевод) и ставят в термостат при  $t = 25-32^{\circ} \text{C}$  на 2-7 суток.

2). Проводят посев культуры молочнокислых бактерий на чашки Петри со средой для выявления амилолитической активности.

### **Занятие 6.**

1). Студенты регистрируют изменение pH по изменению цвета индикатора бромтимолового синего для определения ферментативной активности.

2). Замеряют линейкой зону гидролиза крахмала.

3). Результаты наблюдений сравнивают с показателями роста в контрольной среде, не содержащей источника углевода. Записывают в рабочую тетрадь.

1. Какие соединения углерода используют молочнокислые бактерии для энергетического и конструктивного метаболизма?

2. Какие потери энергии наблюдаются при сбраживании углеводов гомоферментативными и гетероферментативными молочнокислыми бактериями?

3. Что такое аэробная стабильность консервированных кормов?

Самостоятельная работа студентов

Контрольные вопросы

	4. Как влияет состав среды и другие условия на характер продуктов брожения, образуемых молочнокислыми бактериями.
Подведение итогов занятий:	Выставление оценок по теоретической части, прием выполнения практической части, изложение замечаний.
Домашнее задание:	Устойчивость молочнокислых бактерий к повышенному осмотическому давлению
Литература:	[7] [11]

### Занятие 7 – 8

Тема занятия:	Устойчивость молочнокислых бактерий к повышенному осмотическому давлению
Цель занятий:	Определение влияния растворов поваренной соли на развитие молочнокислых бактерий силоса и сенажа.
Время	4 часа
Место работы:	Лаборатория кафедры микробиологии и вирусологии
Оборудование и материалы:	1). 24 часовая культура молочнокислых бактерий, выросшая на сусле; 2). сусло, содержащее хлористый натрий (от 4,6 до 10%); 3). пипетки, пробирки; 4). микроскоп (увеличение 900)
Методические указания	Преподаватель поясняет, что культуры молочнокислых бактерий по-разному относятся к повышенному осмотическому давлению среды. Молочнокислые бактерии сенажа более осмофильны, чем молочнокислые бактерии силоса. Особый акцент преподаватель делает на том, что при силосовании провяленных трав должны применяться закваски на основе осмоотолерантных молочнокислых бактерий.

#### **Занятие 7.**

Для создания разности осмотического давления внутриклеточного содержимого микроорганизмов и внешней среды в культуральную жидкость вносится разная концентрация хлористого натрия (4,6 – 10%).

Среду (сусло жидкое) инокулируют 3 каплями 24 часовой культуры и инкубируют в течение 3-х суток при  $t = 30^{\circ}$ .

#### **Занятие 8.**

По истечению указанного срока определяют рост культур по мутности среды в культуральных жидкостях молочнокислых бактерий. О влиянии разных концентраций хлористого натрия на осмотическое давление в клетках молочнокислых бактерий судят по изменению размера клеток при увеличении  $\times 900$ .

Самостоятельная работа студентов	<p><b>Занятие 7.</b></p> <p>1). Студенты вносят в 12 пробирок с суслон NaCl в разных концентрациях: 4,6%; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0; 9,5 и 10,0%.</p> <p>2). В каждую пробирку с суслон и разной концентрацией NaCl вносят по 3 капли культуры молочнокислых бактерий, выросших на сусле. Ставят в термостат при <math>t = 30^{\circ}</math>.</p> <p><b>Занятие 8.</b></p> <p>1). Определяют визуально рост молочнокислых бактерий в культуральных жидкостях по мутности среды. Микроскопируют под увеличением 900 и наблюдают изменение размера клеток бактерий в зависимости от разной концентрации NaCl.</p> <p>3). Результаты наблюдений сравнивают с показателями роста в контрольной среде, не содержащей NaCl.</p>
Контрольные вопросы	<p>1. Какова водоудерживающая сила в сенаже и осмотическое давление у большинства бактерий?</p> <p>2. Какие бактерии относятся к осмоотерантным?</p> <p>3. Как отличаются по устойчивости к высокому осмотическому давлению молочнокислые бактерии?</p>
Подведение итогов занятий:	Выставление оценок по теоретической части, прием выполнения практической части, изложение замечаний.
Домашнее задание:	Определение антибиотической активности молочнокислых бактерий.
Литература:	[2] [5] [7]

### Занятие 9 – 11

Тема занятия:	Определение антибиотической активности молочнокислых бактерий.
Цель занятий:	Определение способности молочнокислых бактерий образовывать антибиотические вещества.
Время	6 часов
Место работы:	Лаборатория кафедры микробиологии и вирусологии
Оборудование и материалы:	тест-культуры, пробирки с жидким суслон, скошенным агаром, чашки Петри, пипетки, петли, шпатели, молочнокислые бактерии, агаризованная среда в чашках Петри, линейка или миллиметровая бумага.
Методические указания	Преподаватель подчеркивает, что антибиотическая активность молочнокислых бактерий является по современным представлениям одним из консервирующих факторов силоса и сенажа.

### **Занятие 9.**

Молочнокислые бактерии высеваются в жидкое сусло и выращиваются в термостате в течение 3 суток при  $t = 30^{\circ}$ . На скошенный агар высевают тест-культуры – *E.coli*, *St. aureus*, *Bac.mycoides*, *Candida sp.* или *Saccharomyces*, *Bac. subtilis*.

### **Занятие 10.**

Инокулянты с культурами центрифугируют при 5 тыс. об/мин. Из выросших на косяках тест-культур готовят суспензию в стерильной воде, затем по одной капле пипеткой вносят в чашки Петри на агаризованную среду (МПБ: жидкое сусло 0,5:1) и распределяют по всей поверхности чашки шпателем. На поверхность среды с высеянными тест-объектами помещают стеклянные цилиндрики (по 3 шт. на каждую культуру молочнокислых бактерий), в которые стерильными пипетками вносят по 3 капли центрифугата и культивируют при  $25 - 30^{\circ}$  в течение 8 – 10 суток. Контролем служит раствор молочной кислоты с усредненной титруемой кислотностью для молочнокислых бактерий ( $45^{\circ}$ ).

### **Занятие 11.**

Учет зон отсутствия роста вокруг цилиндриков после инкубации. Если тест-организм чувствителен к антибиотическому веществу молочнокислых бактерий, то после инкубации вокруг цилиндриков образуются зоны отсутствия роста тест-культур. Чем больше выделяется антибиотического вещества, тем больше диаметр зоны лизиса.

Самостоятельная  
работа студентов

### **Занятие 9.**

- 1). Студенты делают посев молочнокислых бактерий в пробирки с жидким суслем, культивируют при  $t = 30^{\circ}$  C в течение 3 суток.
- 2). Делают посев 5 тест-культур со скошенным МПА.

### **Занятие 10.**

- 1). Центрифугируют инокулянты с культурами при 5 тыс. об/мин.
- 2). Готовят суспензию в стерильной воде из выросших на косяках с МПА культур.
- 3). Засевают 5 чашек Петри с агаризованной средой тест-культурами (по 1 капле) суспензии.
- 4). Помещают стеклянные цилиндрики на поверхность среды с высеянными тест-культурами и вносят по 3 капли центрифугата молочнокислых бактерий. Помещают в термостат при  $t = 25-32^{\circ}$  C на 8-10 суток.

### **Занятие 11.**

1). Проводят учет зон задержки роста вокруг цилиндров после инкубации.

2). Студенты измеряют зоны лизиса.

3). Записывают в тетрадь результаты.

Контрольные  
вопросы

1. Какие знаете методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотическим веществам?

2. Какие зоны задержки роста соответствуют малой, средней и высокой чувствительности микроорганизмов к антибиотикам?

Подведение  
итогов занятий:  
Домашнее  
задание:  
Литература:

Выставление оценок по теоретической части, прием выполнения практической части, изложение замечаний.

[3] [4] [6]

Репозиторий БарГУ

## Литература

1. Асонов, Н.Р. Микробиология: учебник для студентов высших учебных заведений / Н.Р. Асонов. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Колос, 2001. – 352 с.
2. Егоров, Н.С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / Н.С. Егоров. – М.: Изд-во Московского ун-та, 1983. – 215 с.
3. Зубрилин, А.А. Силосование кормов / А.А. Зубрилин, Е.И. Мишутский. – М.: Изд-во Академии наук СССР, 1958. –
4. Использование бактериальных консервантов для повышения продуктивного действия кормов / С.В. Абрамова [и др.] // Вестн НАН Беларуси. сер. аграрных наук. – №4.- 2004.-С. 87-91.
5. Квасников, Е.И. Антибиотические свойства *L. breve* / Е.И. Квасников, В.И. Суденко // Микробиологічні журнал. 1967. – Т.29, вып.2. – С. 149.
6. Квасников, Е.И. Биология молочнокислых бактерий / Е.И. Квасников. – Ташкент, 1960
7. Лапотышкин, Р.А. Влияние NaCl на развитие молочнокислых бактерий силоса и сенажа и их антибиотическая активность / Р.А. Лапотышкин, Г.И. Переверзева // Труды ТСХА. – М., 1980. – С.15-20.
8. Микробиология растительных кормов: учеб.-метод. пособ. к лабораторно-практическим занятиям по микробиологии для студентов спец. "Зоотехния", слушателей ФПК / С.В. Абрамова [и др.]. - Витебск, 2003. - 35 с.
9. Победнов, Ю.А. Влияние бактериальных препаратов на аэробную стабильность силоса / Ю.А. Победнов // Кормопроизводство. – 1997. – №11. – С.24-26.
10. Уотсон, С.Дж. Приготовление и использование сена и силоса / С.Дж. Уотсон, М.Дж. Нэйп. – М.: Колос, 1964. – 378 с.
11. Федулina Н.Н. Физиолого-биохимические свойства молочнокислых бактерий сенажа / Н.Н. Федулina, Л.П. Чистякова // Сельскохозяйственная биология. – 1975. – Т.10, №3. – С. 429-433.
12. Худокормов, В.В. Эффективность консервирования провяленных трав препаратом Биотроф и использования полученного корма в рационах крупного рогатого скота: автореф. дис...канд. с.-х. наук / В.В. Худокормов; Всерос. НИИ кормов им. В.Р. Вильямса. - М., 2002. - 16 с.: табл.
13. Чуканов, Н.К. Микробиология консервирования трудносилосуемых растений / Н.К. Чуканов, А.К. Попенко – Алма-Ата: Наука, 1986.-191с.
14. Шлегель, Г. Общая микробиология / Г. Шлегель. – М.: Мир, 1972.-С.241-246
15. Яковчик, Н.С. Кормопроизводство. Современные технологии / Н.С. Яковчик; Ред. П.С. Плященко. - Барановичи: Барановичская укрупненная типография, 2004. – 280 с: ил. - Библиогр.: с. 273-275.

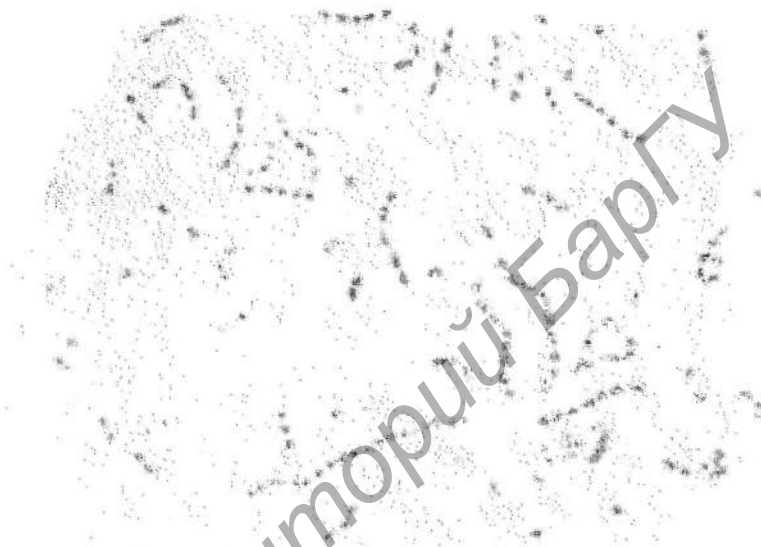
Род *Streptococcus*

Рис. 14. Молочнокислый стрептококк (*Streptococcus lactis*)  
(X 800)

Представители этого рода встречаются в растениях и в молоке. Типичной формой является *Str. lactis* (рис. 14), сбраживающий, помимо моносахаридов, молочный сахар и мальтозу. Сахароза, раффиноза и рамноза им не сбраживаются. Максимальная температура развития лежит около 38—40°. Некоторые виды, например, *Str. thermophilus*, могут развиваться при повышенной температуре. Температурный максимум — около 50°. Из дисахаридов *Str. thermo-philus* сбраживает сахарозу, но не усваивает мальтозы и пентоз.

## Род *Streptobacterium*

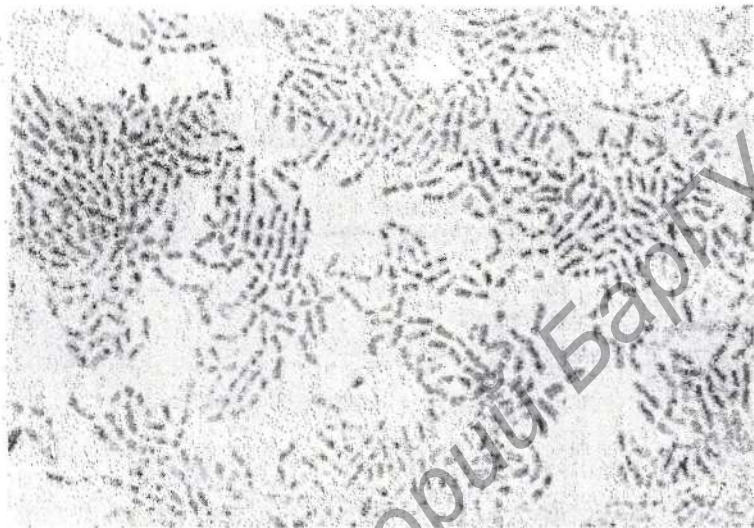


Рис. 15. Молочнокислая палочка (*Streptobacterium planarum*)  
(X 800)

Представители этого рода точно также довольно широко распространены на растениях и в молочных продуктах. Типичной формой может служить *Streptobact. planarum* сбраживающий мальтозу, сахарозу, часто раффинозу и интозы. Найден в хлебных заквасках и на растениях. Клетки его представляют собой небольшие палочки (рис. 15)

Максимович, Н.Н. Андросик, П.А. Красочко, А.А. Гласкович. – Витебск, 2000. – 20 с.

12. Лабораторная диагностика бактериальных инфекций домашних животных: учебно-методическое пособие для студентов по спец. "Ветеринарная медицина" и слушателей ФПК/ А.А. Вербицкий, В.В. Максимович, А.А. Солонко и др; Витебская государственная академия ветеринарной медицины. - Витебск: УО ВГАВМ, 2006. - 137 с.: табл. - Библиогр.: с. 136.

13. Медведев, А.П. Приготовление питательных сред из мяса и контроль их качества: учебно-метод. пособ. для студентов, преподавателей и слушателей ФПК по специальности «Ветеринарная медицина» / А.П. Медведев, А.А. Вербицкий, В.Н. Алешкевич. – Витебск, 2003. – 14 с.

14. Медведев, А.П. Основные формы поствакцинальных осложнений при проведении специфической профилактики бактериальных инфекций животных: учебно-метод. пособ. для студентов, преподавателей и слушателей ФПК по специальности «Ветеринарная медицина» / А.П. Медведев, А.А. Вербицкий, В.Н. Алешкевич и др. – Витебск, 2003. – 23 с.

15. Медведев, А.П. Генетика микроорганизмов: учебно-методическое пособие для студентов фак. ветеринарной медицины и слушателей ФПК / А.П. Медведев, А.А. Вербицкий, Ю.И. Шапиро; УО ВГАВМ. – Витебск, 2004. – 108 с. – Библиогр.: с.108.

16. Медведев, А.П. Противобактериальные гипериммунные сыворотки: монография / А.П. Медведев, А.А. Вербицкий. – Витебск, 2001. – 121 с. – Библиогр.: с.119-121.

17. Медведев, А.П. Противобактериальные лечебно-профилактические сыворотки: монография. – Витебск: УО ВГАВМ, 2007. – 379 с.

18. Методические рекомендации и задания по выполнению контрольных работ по микробиологии и иммунологии: Для студентов фак. заочного обучения по спец. "Ветеринарная медицина"/ А.А. Вербицкий, В.Н. Алешкевич, А.П. Медведев, А.А. Солонко, Р.Б. Корочкин; УО ВГАВМ. Кафедра микробиологии и вирусологии. - Витебск, 2003. - 13 с. - Библиогр.: с. 12.

19. Методические рекомендации по контролю качества питательных сред для микроорганизмов / А.П. Медведев, А.А. Вербицкий, С.В. Даровских, М.В. Грибанова, А.В. Зайцева, О.М. Куришко. – Витебск: УО ВГАВМ, 2006. – 16 с.

20. Микробиология кукурузного силоса: Учеб.-метод. пособ. к лабораторно-практическим занятиям по микробиологии для студентов очной и заочной формы обучения, НИСПО по спец. "Зоотехния"/ С.В. Абраскова, А.А. Гласкович, А.А. Вербицкий, О.Ф. Ганущенко; УО ВГАВМ. Кафедра кормления сельскохозяйственных животных. - Витебск, 2003. - 24 с. - Библиогр.: с. 23.

21. Микробиология растительных кормов: учебно-методическое пособие к лабораторно-практическим занятиям по микробиологии для студентов спец. "Зоотехния", слушателей ФПК / С.В. Абраскова, А.А. Гласкович, А.А. Вербицкий, О.Ф. Ганущенко. – Витебск, 2003. – 35 с. – Библиогр.: с.33.

Учебно-методическое издание

Абраскова Светлана Викторовна  
Гласкович Алефтина Абликасовна  
Вербицкий Анатолий Анатольевич

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА  
ЗАКВАСОК, ПРИМЕНЯЕМЫХ ПРИ КОНСЕРВИРОВАНИИ КОРМОВ**

учебно-методическое пособие для студентов обучающихся  
по специальности «Зоотехния», преподавателей и  
слушателей ФПКиПК

Ответственный за выпуск А.А.Вербицкий

Оригинал сверстан и отпечатан в УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная  
академия ветеринарной медицины»

Подписано в печать 10.10.07. Формат 60 x 90 1/16  
Бумага писчая. Усл.печ. л. - 1,9. Тираж - 180 экз. Заказ №593  
Усл.изд. л. - 2,0

210026, г. Витебск, ул.1-я Доватора, 7/11  
Отпечатано на ризографе УО ВГАВМ  
Лицензия № 02330/0133019 от 30.04.2004г.