

**Министерство сельского хозяйства и продовольствия
Республики Беларусь**

Учреждение Образования
«Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия
ветеринарной медицины»

Кафедра микробиологии и вирусологии
Кафедра кормления с.-х. животных им. профессора Лемеша В.Ф.

МИКРОБИОЛОГИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ КОРМОВ

Учебно-методическое пособие к лабораторно-практическим занятиям по микробиологии для студентов специальности 2-740301 «Зоотехния», слушателей ФПК, специалистов кормопроизводства, аспирантов и преподавателей.

Витебск 2003

Авторы: **Абраскова Светлана Викторовна**, кандидат с.-х. наук, вед. н. сотр. отдела полевого кормопроизводства РНИУП «Институт земледелия и селекции НАН Беларуси».
Гласкович Алефтина Абликасовна, кандидат вет. наук, доцент УО «ВГАВМ»
Вербицкий Анатолий Анатольевич, зав. кафедрой, кандидат вет. наук, доцент. УО «ВГАВМ»
Ганушенко Олег Федорович, кандидат с.-х. наук, доцент УО «ВГАВМ»

Рецензенты:

доктор вет. наук, профессор кафедры микробиологии и вирусологии
Медведев А.П.

кандидат с.х.н., доцент кафедры кормопроизводства **Шагалеев Ф.Ф.**
кандидат вет. наук, доцент, зав. кафедрой болезней мелких животных и птиц **Зелотков Ю.Г.**

Учебно-методическое пособие.

Рассмотрено и рекомендовано к печати методической комиссией зооинженерного факультета УО «ВГАВМ»
« 17 » октября 2003 г. (протокол № 1)

Разрешено к печати редакционно-издательским советом УО «ВГАВМ»
«28» октября 2003 г. (протокол № 3)

Введение

Консервирование кормов в настоящее время сопровождается большими потерями. Если силосование выполняется надлежащим образом, к примеру, в горизонтальных силосохранилищах потери составляют в среднем около 20%. При неквалифицированной работе они значительно возрастают. На основании многочисленных исследований можно констатировать, что величину потерь, вызванных деятельностью микроорганизмов кормов, часто недооценивают. При составлении кормового баланса предусматриваются только «неизбежные» потери в результате «угара». Однако, следует иметь в виду, что силос, находившийся под испорченным в результате вторичного брожения слоем (верхний и боковые слои), характеризуется высоким рН и непригоден для скармливания. Сенаж, подвернувшийся самосогреванию в результате аэробных процессов, теряет свое кормовое достоинство наполовину. Плесневелое сено, зерно, кислый силос является причиной многих болезней с.-х. животных.

Знание физиолого-биохимических особенностей отдельных групп микроорганизмов, встречающихся в консервированных кормах, и факторов, ограничивающих или стимулирующих их развитие необходимо для того, чтобы исключить ошибки при заготовке, хранении и скармливании консервированных кормов.

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

1. Краткая характеристика микроорганизмов кормов.

1.1. Эпифитная микрофлора. ее состав и особенности.

Эпифитная микрофлора – это микроорганизмы, встречающиеся на поверхности растущих растений. Ее количественный и качественный (видовой) состав сильно колеблется и зависит от времени года, местности, вида и стадии развития растений, степени их загрязненности и многих других условий. Так, на 1 г сырой массы приходилось следующее количество микроорганизмов: свежая лугопастбищная трава – 160000, люцерна – 1600000, кукуруза – 17260000.

В разнообразной микрофлоре содержится лишь сравнительно небольшое количество молочнокислых бактерий (таблица 1).

Таблица 1

Количественный и качественный состав микроорганизмов, клеток/ г

Корм	Молочнокислые бактерии	Гнилостные бактерии	Маслянокислые бактерии	Дрожжи
Свежая лугопастбищная трава	10	-	300	1100
Свежая люцерна	10	250	100	4000
Кукуруза	100000-3450000	1300-4200	1-100	140-150

В 1 г люцерны насчитывалось около 1,6 млн. микроорганизмов, но среди них было только 10 молочнокислых бактерий. Следовательно, на 1 желательный микроорганизм приходилось 160000 нежелательных. Исключение составляет кукуруза. На 1 г свежей массы этого растения приходилось более 100000 молочнокислых бактерий. По-видимому, хорошая силосуемость кукурузы объясняется как благоприятным соотношением питательных веществ, так и большей численностью молочнокислых бактерий. Этими же факторами обуславливается хорошая силосуемость также других кормов с повышенным содержанием сахаров (свекловичная ботва, просо и др.).

Таким образом, на растениях находится огромное количество разнообразных микроорганизмов, однако это количество незначительно по сравнению с плотностью микроорганизмов после закладки и хранения в том или ином хранилище.

1.2. Микробиологические процессы, происходящие при силосовании.

Количественный и качественный (видовой) состав сообщества микроорганизмов, участвующих в созревании силоса, также зависит от ботанического состава зеленой массы, содержания в ней растворимых углево-

дов и протеина, влажности исходной массы. Так, например, сырье богатое белками (клевер, люцерна, донник, эспарцет) в отличие от сырья, богатого углеводами (кукуруза, просо и др.), силосуется при длительном участии в процессах гнилостных бактерий и при замедленном нарастании численности молочнокислых бактерий.

Однако, в любом случае после закладки растительной массы в хранилище наблюдается массовое размножение микроорганизмов. Их общее количество уже через 2-9 суток может значительно превышать количество микроорганизмов, попадающих с растительной массой (таблица 2).

При всех способах силосования в созревании силосов участвует сообщество микроорганизмов, состоящее из двух диаметрально противоположных групп по характеру воздействия на растительный материал: вредные (нежелательные) и полезные (желательные) группы [2]. Характер их взаимоотношений варьирует не только от симбиотических до антагонистических, обуславливающих в конечном итоге успех или неудачу в исходе силосования, но и от природы силосуемого материала, воздушного и температурного режима [5].

Таблица 2

Динамика развития молочнокислых и гнилостных микроорганизмов при силосовании кукурузы и клевера.

Анализируемый материал	Количество микроорганизмов (млн. на 1 г силосуемой массы)	
	Молочнокислые	Гнилостные
Исходная масса кукурузы с початками	0,2	19,6
Силос: 2-суточный	620,0	430,0
7-суточный	483,0	105,0
15-суточный	14,0	0,0015
Исходная масса клевера	0,013	6,2
Силос: 5-суточный	5,5	500,0
9-суточный	650,0	10,0
30-суточный	50,0	7,0

Таким образом, в процессе силосования происходит замена гнилостных микроорганизмов молочнокислыми, которые вследствие образования молочной и частично уксусной кислот снижают рН корма до 4,0-4,2 и тем самым создают неблагоприятные условия для развития гнилостных микроорганизмов (табл.2).

Условия для существования (потребность в кислороде, отношение к температуре, активной кислотности и т.д.) для различных групп микроорганизмов неодинаковые. С точки зрения потребности в кислороде различают условно три группы микроорганизмов:

- размножающиеся только при полном отсутствии кислорода (облигатные анаэробы);
- размножающиеся только при наличии кислорода (облигатные аэробы);
- размножающиеся как при наличии кислорода, так и без него (факультативные анаэробы).

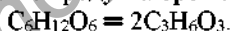
Большинство микроорганизмов, которые вызывают порочное брожение, не выдерживают рН ниже 4,0, поэтому желательно быстро достичь этого оптимального уровня кислотности.

Чтобы ограничить деятельность вредных микроорганизмов и стимулировать размножение полезных бактерий следует знать особенности отдельных групп микроорганизмов. В таблице 3 схематично представлены физиолого-биохимические особенности основных представителей микроорганизмов, участвующих в процессах силосования.

1.2.1. Молочнокислые бактерии.

Среди разнообразной эпифитной микрофлоры растений содержится лишь сравнительно небольшое количество неспорообразующих факультативных анаэробов, гомо-, гетероферментативных молочнокислых бактерий. Их численность при благоприятных условиях силосования быстро достигает 10^4 - 10^8 , а иногда – 10^9 , а оптимальным количеством считают 10^5 - 10^7 клеток/г сырого материала.

Основным свойством молочнокислых бактерий, по которым их объединяют в отдельную обширную группу микроорганизмов, является способность образовывать в качестве продукта брожения молочную кислоту:

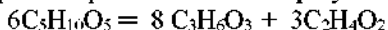


глюкоза молочная кислота

Она создает в среде активную кислотность (рН 4,2 и ниже), неблагоприятно действующую на нежелательные микроорганизмы. Помимо этого, значение молочнокислых бактерий заключается в бактерицидном действии недиссоциированной молекулы молочной кислоты и способности их образовывать специфические антибиотические и др. биологически активные вещества.

В процессе брожения, протекающем в обычных благоприятных условиях, гомоферментативные молочнокислые бактерии (*Streptococcus* sp., *Pediococcus* sp., *Lactobacterium plantarum* и др.) образуют из глюкозы (гексозы) преимущественно молочную кислоту по гликолитическому пути Эмбдена-Мейергофа-Парнаса. Выход молочной кислоты составляет 95-97%. Одновременно образуются следовые количества летучих кислот, этилового спирта, фумаровой кислоты и углекислоты. Из субстрата извлекается значительно меньше энергии, чем при других (аэробных) процессах энергетического обмена. Тем не менее этот путь энергетических превращений при достаточном уровне углеводов обеспечивает быстрое развитие

культур. Кроме глюкозы субстратом для гомоферментативного молочнокислого брожения могут служить другие гексозы (фруктоза, манноза, галактоза), пентозы (ксилоза, арабиноза), дисахариды (лактоза, мальтоза, сахароза) и полисахариды (декстрины). Негидролизованный крахмал не доступен для большинства молочнокислых бактерий. В растениях при сбраживании пентоз (сахаров с пятью атомами углерода) молочнокислыми бактериями кроме молочной образуется и уксусная кислота:



пентоза молочная кислота уксусная кислота

Уксуснокислые бактерии являются ацидофилами, то есть переносят кислую среду. Но так как они являются аэробами, поэтому в хорошо уплотненной массе они не способны развиваться.

Гетероферментативные формы (*Leuconostoc* sp., *Lactobacillus* sp.) сбраживают углеводы пентозофосфатным путем. Они менее желательны в силосе, так как кроме молочной кислоты образуют значительное количество побочных продуктов распада углеводов (этиловый спирт, уксусная кислота, углекислый газ, глицерин и др.), используя на это до 50% сбраживаемых углеводов (гексозы, пентозы). Судя по интенсивности роста гетероферментативных бактерий, выход энергии на 1 моль глюкозы оказывается на одну треть ниже, чем у гомоферментативных молочнокислых бактерий.

Таблица 3

Условия существования микроорганизмов в силосе

Микроорганизмы	Разлагают			Потребность в кислороде
	углеводы	белок	молочную кислоту	
Молочнокислые	До молочной кислоты и некоторых побочных продуктов	-	-	Факультативные анаэробы
Маслянокислые (клубоцилли)	До масляной кислоты и CO ₂	До аминокислот, аминов, аммиака	До масляной кислоты, CO ₂ и H ₂	Облигатные анаэробы
Гнилостные (бациллы)	До газов	До аминов, аммиака	До газов	Облигатные аэробы
Грибы: плесневые дрожжи	До CO ₂ и H ₂ O	До аминокислот, аммиака	До CO ₂ и H ₂ O	Облигатные аэробы Факультативные анаэробы
	До спирта и CO ₂	До аминокислот, аммиака	До спирта	

Продолжение таблицы 3

Требования		Образуют споры	Влияние на качество силоса и молочные продукты
кислотности, рН	температуры, С°		
Оптимальная 3,3-8,0 Минимальная 3,0-3,5	10-35(60)	-	Желательны: молочная кислота – консервирующий фактор, образуют др. биологически активные вещества
4,5-6,5 4,2-4,4	35-40	+	Вредны: разлагают углеводы, молочную кислоту и белок, «вспучивают» сыры
4,4-8,5 5,0-5,5	10-60	+	Вредны: разлагают углеводы, белок, молочную кислоту, с образованием токсичных аминов
7,0-9,0 2,5-3,0	0-60	+	Вредны: образуют токсины, в крайних случаях делают корм непригодным
3,0-7,0 1,2-2,2	0-60	+	Вредны: возбудители вторичных процессов брожения

Существует целый ряд причин, в силу которых молочнокислые бактерии не занимают доминирующего положения. Существенным фактором, лимитирующим размножение молочнокислых бактерий, является низкое содержание легкосбраживаемых углеводов (моно- и дисахаридов) в исходной траве. Повышенные требования молочнокислых бактерий распространяются не только на определенные углеводы, но и на аминокислоты, витамины. Даже при незначительном недостатке этих веществ, несмотря на прочие оптимальные условия (отсутствие кислорода, оптимальная температура), молочнокислые бактерии не всегда размножаются.

Температурный фактор влияет как на рост молочнокислых бактерий, так и на характер конечных продуктов брожения. Педиококки, преобладающая форма молочнокислых бактерий в первые дни созревания силоса, хорошо растут при 45°С. Оптимальной температурой роста палочковидных форм молочнокислых бактерий (*L. plantarum*, *L. brevis*), которые приходят на смену коккам, является 30-35°С. При температуре выше 40°С их количество резко падает, угнетается кислотообразование в 1,3-3 раза. Установлено, что наибольший выход молочной кислоты и наименьший – уксусной наблюдается при температуре ниже 30°С.

Для получения качественного силоса не меньшее значение имеет создание анаэробных условий – плотная трамбовка и хорошая герметизация. В силосе, полученном в негерметичных условиях (аэробных), количество молочнокислых бактерий после начального увеличения быстро падает, в герметичных (анаэробных) – оно остается высоким. На седьмые сутки брожения при анаэробных условиях наблюдается высокий процент гомоферментативных бактерий, в аэробных – педиококков. Хотя позднее в этом силосе и появляется достаточное количество молочнокислых пало-

чек, но они уже не могут предотвратить размножение нежелательных микроорганизмов.

Таким образом, молочнокислые бактерии отличаются следующими особенностями, важными для силосования:

1. Нуждаются для обмена веществ, главным образом, в углеводах (сахар, реже крахмал);
2. Белок не разлагают (некоторые виды в ничтожном количестве);
3. Они факультативные анаэробы, т.е. развиваются без кислорода и при наличии кислорода;
4. Температурный оптимум чаще всего составляет 30°C (мезофильные молочнокислые бактерии), но у некоторых форм он достигает 60°C (термофильные молочнокислые бактерии);
5. Выдерживают кислотность до pH 3,0;
6. Могут размножаться в силосе с очень высоким содержанием сухого вещества.
7. Легко переносят высокие концентрации NaCl и обладают устойчивостью к некоторым другим химическим препаратам.
8. Помимо молочной кислоты, которая играет решающую роль в подавлении нежелательных типов брожения, молочнокислые бактерии выделяют биологически активные вещества (витамины группы B и др.). Они обладают профилактическими (или лечебными) свойствами, стимулируют рост и развитие с.-х. животных.

При благоприятных условиях (достаточное содержание в исходном растительном материале водорастворимых углеводов, анаэробиз) молочнокислое брожение заканчивается всего за несколько дней и pH достигает оптимального значения – 4,0-4,2.

1.2.2. Маслянокислые бактерии.

Маслянокислые бактерии (*Clostridium* sp.) - спорообразующие, подвижные, палочковидные анаэробные маслянокислые бактерии (клубридии) широко распространены в почве. Присутствие клубридией в силосе является результатом загрязнения почвой, поскольку их численность на зеленой массе кормовых культур, как правило, очень низка. Почти сразу же после заполнения хранилища зеленой массой маслянокислые бактерии начинают интенсивно размножаться вместе с молочнокислыми в первые несколько дней.

Высокая влажность растений, обуславливающаяся наличием в измельченной силосной массе клеточного сока растений и анаэробные условия в силосохранилище – идеальные условия для роста клубридией. По-

этому уже к концу первых суток их численность возрастает и в дальнейшем зависит от интенсивности молочнокислого брожения. В случае слабого накопления молочной кислоты и снижения рН маслянокислые бактерии энергично размножаются и число их достигает максимума (10^3 - 10^7 клеток/г) в несколько суток.

По мере увеличения влажности (при содержании в силосной массе 15% сухого вещества) чувствительность кластридий к кислотности среды снижается даже при рН 4,0 (4)

Трудно указать точное критическое значение рН силоса, при котором начинается ингибирование кластридий, так как оно зависит не только от количества образованной молочной кислоты, но также от воды в корме и температуры среды.

Кластридии чувствительны к недостатку воды. Доказано, что с увеличением свободной воды чувствительность этих бактерий к кислотности среды снижается.

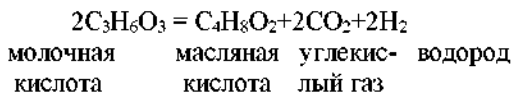
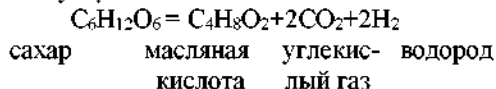
Температура корма оказывает заметное влияние на рост кластридий. Оптимальная температура для роста большинства этих бактерий около 37°C. Высокой термоустойчивостью характеризуются споры кластридий. Поэтому маслянокислые бактерии могут долгое время сохраняться в силосе в виде спор и при попадании в благоприятные условия для их развития начинают размножаться. Этим объясняется расхождение в биохимических и микробиологических показателях силоса: масляная кислота отсутствует, а титр маслянокислых бактерий в этих же образцах корма высокий.

Изучение в силосе продуктов маслянокислого брожения показало, что встречаются две физиологические группы: сахаролитические и протеолитические.

Сахаролитические кластридии (*Cl. butyricum*, *Cl. pasteurianum*) сбраживают главным образом моно- и дисахариды. Количество образовавшихся продуктов разнообразно (масляная, уксусная, муравьиная кислоты, бутиловый, этиловый, амиловый и пропиловый спирты, ацетон, водород и углекислота) и сильно колеблется. Это обусловлено видовой принадлежностью микроорганизмов, субстратом, рН, температурой. Отношение углекислоты и водорода обычно 1:1. Предполагается, что масляная кислота возникает в результате конденсации двух молекул уксусной кислоты. Непосредственное образование масляной кислоты не может служить источником энергии для кластридий. Для поддержания их жизнедеятельности необходима уксусная кислота, которая образуется при окислении уксусного альдегида в результате декарбоксилирования пировиноградной или молочной кислоты.

К сахаролитическим кластридиям, сбраживающим молочную кислоту и сахар, относят *Cl. butyricum*, *Cl. tyrobutyricum*, *Cl. paraputrificum*. В силосе с преобладанием этих кластридий обычно почти не обнаруживают

молочную кислоту и сахар. В основном присутствует масляная, хотя нередко может быть много уксусной кислоты.



Протеолитические клостридии образуют, главным образом, белки, а также аминокислоты и амиды. В результате катаболизма аминокислот образуются летучие жирные кислоты, среди которых преобладает уксусная. Выявлено значительное участие протеолитических клостридий в разложении и углеводов. В силосах встречаются протеолитические клостридии видов *Cl.sporogenes*, *Cl.acetobutyricum*, *Cl.subterminale*, *Cl.bifermentas*. Количество масляной кислоты в силосе – надежный показатель масштабов деятельности клостридий.

Маслянокислое брожение приводит к высоким потерям питательных веществ в результате катаболизма белков, углеводов и энергии. Энергии теряется в 7-8 раз больше, чем при молочнокислом. Кроме того, происходит смещение реакции силоса в нейтральную сторону из-за образования щелочных соединений при расщеплении белка и молочной кислоты. Органолептические показатели корма ухудшаются вследствие накопления масляной кислоты, аммиака и сероводорода. При кормлении коров таким силосом споры клостридий с молоком попадают в сыр и, прорастая в нем при определенных условиях, могут быть причиной его «вспучивания» и прогоркания.

Таким образом, для возбудителей маслянокислого брожения характерны следующие основные физиолого-биохимические особенности:

1. Маслянокислые бактерии, являясь облигатными анаэробами, начинают развиваться в условиях сильного уплотнения силосной массы;
2. Разлагая сахар, они конкурируют с молочнокислыми бактериями, а используя белки и молочную кислоту, приводят к образованию сильнощелочных продуктов распада белка (аммиака) и токсичных аминов;
3. Маслянокислые бактерии нуждаются для своего развития во влажном растительном сырье и при высокой влажности исходной массы имеют наибольшие шансы подавить все остальные типы брожения;
4. Оптимальные температуры для маслянокислых бактерий колеблются от 35-40°C, но их споры переносят более вы-

сокие температуры.

5. Чувствительны к кислотности и прекращают свою деятельность при рН ниже 4,2.

Эффективными мерами против возбудителей маслянокислого брожения являются – быстрое подкисление растительной массы, подвяливание влажных растений. Существуют биопрепараты на основе молочнокислых бактерий для активации молочнокислого брожения в силосе. Кроме того, разработаны химические вещества, которые оказывают бактерицидное (подавляющее) и бактериостатическое (тормозящее) действие на маслянокислые бактерии.

1.2.3. Гнилостные бактерии (*Bacillus*, *Pseudomonas*).

Представители рода бацилл (*Bac.mesentericus*, *Bac.megatherium*) сходны по своим физиолого-биохимическим особенностям с представителями клостридий, но в отличие от них способны развиваться в аэробных условиях. Поэтому они одними из первых включаются в процесс ферментации и чаще всего встречаются в количестве 10^4 - 10^6 , но в некоторых случаях (нарушения технологии) – до 10^8 - 10^9 . Эти микроорганизмы являются активными продуцентами разнообразных гидролитических ферментов. Они используют в качестве питательных веществ различные белки, углеводы (глюкозу, сахарозу, мальтозу и др.) и органические кислоты. Значительная часть белкового азота (до 40% и более) под действием бацилл может быть переведена в аминную и аммиачную форму, а часть аминокислот в моно- и диамины, особенно в условиях медленного подкисления массы. Декарбоксилирование имеет свой максимум в кислой среде, тогда как дезаминирование происходит в нейтральной и щелочной. При декарбоксилировании могут возникать амины. Некоторые из них обладают токсическими свойствами (индол, скатол, метилмеркаптан и др.) и при скармливании силоса эти вещества поступая в кровь, вызывают различные заболевания и отравления животных. Некоторые виды бацилл образуют глюкозу, образуя 2, 3-бутиленгликоль, уксусную кислоту, этиловый спирт, глицерин, углекислоту и в следовых количествах муравьиную и янтарную кислоты.

Важным свойством гнилостных бактерий, которое имеет значение для протекающих в кормовой массе процессов, является их способность к спорообразованию. В некоторых разложившихся силосах, особенно кукурузном, были обнаружены бактерии, относящиеся к видам *Bacillus*. Они, видимо, свойственны силосу, а не привнесены извне (с воздухом). Из многих силосов после их длительного хранения выделяются бациллы, хотя в исходной траве они почти не обнаруживаются. Исходя из этого, было высказано предположение, что некоторые гнилостные бактерии могут в анаэробных условиях развиваться из спор.

Таким образом, исходя из вышесказанного основными особенностями для возбудителей гнилостного брожения являются следующие:

1. Они не могут существовать без кислорода, поэтому в герметичном хранилище гниение невозможно;
2. Гнилостные бактерии разлагают прежде всего белок (до аммиака и токсичных аминов), а также углеводы и молочную кислоту (до газообразных продуктов);
3. Гнилостные бактерии размножаются при pH выше 5,5. При медленном подкислении корма значительная часть белкового азота переходит в аминную и аммиачную формы;
4. Важным свойством гнилостных бактерий является их способность к спорообразованию. В случае длительного хранения и скармливания силоса, в котором дрожжи и маслянокислые бактерии разложат большую часть молочной кислоты или она будет нейтрализована продуктами разложения белка, гнилостные бактерии, развиваясь из спор, могут начать свою разрушительную деятельность.

Главным условием ограничения существования гнилостных бактерий является быстрое заполнение, хорошая трамбовка, надежная герметизация силосохранилища. Потери, вызываемые возбудителями гнилостного брожения, можно снизить при помощи химических консервантов и биопрепаратов.

1.2.4. Плесневые грибы и дрожжи.

Оба эти типа микроорганизмов относятся к грибам и являются весьма нежелательными представителями микрофлоры силоса. Как следует из таблицы 3, они легко переносят кислую реакцию среды (pH 3,2 и ниже). Поскольку плесневые грибы (*Penicillium*, *Aspergillus* и др.) являются облигатными аэробами, то они начинают развиваться сразу после заполнения хранилища, но с исчезновением кислорода развитие их прекращается. В правильно заполненном силосохранилище с достаточной степенью уплотнения и герметизацией это происходит уже через несколько часов. Если в силосе есть очаги плесени, значит вытеснение воздуха было недостаточным или герметизация была неполной. Опасность плесневения особенно велика в силосе из подвяленного материала, т.к. такой корм, особенно его верхние слои очень трудно уплотнить. В наземных буртах надежная герметизация практически недостижима. Почти 40% силоса заплесневает; корм имеет разложившуюся, мажущуюся структуру и становится непригодным к скармливанию.

Дрожжи (*Hansenula*, *Pichia*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*) развиваются непосредственно после заполнения хранилищ, т.к. они являются факультативными анаэробами и могут развиваться при незначительных количествах кислорода в силосе. Кроме того они обладают высокой

устойчивостью к температурному фактору и низкому рН.

Дрожжевые грибы прекращают свое развитие только при полном отсутствии кислорода в силосохранилище, но небольшие их количества обнаруживаются в поверхностных слоях силоса.

В анаэробных условиях они используют простые сахара (глюкозу, фруктозу, маннозу, сахарозу, галактозу, рафинозу, мальтозу, декстрины) по гликолитическому пути и развиваются за счет окисления сахаров и органических кислот:



сахар спирт углекислый газ

Полное использование последних приводит к тому, что кислая среда силоса сменяется щелочной, создаются благоприятные условия для развития маслянокислой и гнилостной микрофлоры.

При спиртовом брожении наблюдаются большие потери энергии. Если при молочнокислом брожении теряется 3% энергии сахара, то при спиртовом – более половины. В аэробных условиях окисление углеводов дрожжами приводит к получению воды и CO_2 . Некоторые дрожжи используют пентозы (Д-ксилозу, Д-рибозу), полисахариды (крахмал).

Негативное действие дрожжей в процессах вторичного брожения состоит в том, что они развиваются за счет окисления органических кислот, наступающего после законченного брожения при доступе воздуха. В результате окисления молочной и др. органических кислот кислая реакция среды сменяется на щелочную – до рН-10,0. [1]

В результате этого снижается качество силоса из кукурузы, а также из «глубоко» провяленных трав, т.е. кормов с наилучшими показателями по продуктам брожения.

Таким образом, для плесневых грибов и дрожжей свойственно:

1. Плесневые грибы и дрожжи относятся к нежелательным представителям аэробной микрофлоры;
2. Негативное действие плесневых грибов и дрожжей в том, что они вызывают окислительный распад углеводов, белков и органических кислот (в т.ч. молочной);
3. Легко переносят кислую реакцию среды (рН ниже 3,0 и даже 1,2);
4. Плесневые грибы выделяют опасные для здоровья животных и людей токсины;
5. Дрожжи, являясь возбудителями вторичных процессов брожения, приводят к аэробной нестабильности силосов.

Ограничение доступа воздуха путем быстрой закладки, трамбовки и герметизации, правильная выемка и скармливание – решающие факторы, ограничивающие развитие плесневых грибов и дрожжей. Для подавления

развития возбудителей вторичного брожения рекомендованы препараты с фунгистатической (фунгицидной) активностью (приложение 2).

Обобщая вышеизложенное, микроорганизмы в силосе можно разделить на полезные (молочнокислые бактерии) и вредные (маслянокислые, гнилостные бактерии, дрожжи и плесневые грибы).

Исходя из физиолого-биохимических особенностей микроорганизмов, встречающихся в силосе, быстрое снижение pH (до 4,0 и менее) тормозит размножение многих нежелательных микроорганизмов. В таком интервале pH наряду с молочнокислыми могут существовать только плесневые грибы и дрожжи. Но для них требуется кислород. Поэтому для успешного силосования необходимо как можно быстрее удалить воздух из хранилища за счет надежной трамбовки и быстрого заполнения хранилища, надлежащего укрытия. Этим самым обеспечиваются благоприятные условия для молочнокислых бактерий (анаэробов).

В идеальном случае, а именно, при достаточном содержании в исходном растительном материале водорастворимых углеводов и анаэробных условиях молочнокислое брожение занимает доминирующее положение. Всего за несколько дней pH достигает своего оптимального уровня, при котором прекращаются нежелательные типы брожения. При силосовании богатых протеином кормовых растений необходимо их проявлять или использовать химические и биологические консерванты, которые подавляют (ингибируют) развитие нежелательных микроорганизмов и позволяют получить доброкачественный корм независимо от силосуемости и влажности исходного сырья. [8]

1.3. Микробиологические процессы, происходящие при созревании сенажа.

Принято считать, что основное сообщество микроорганизмов, которое выявляется в процессе созревания сенажа представлено так же как и в силосе тремя основными физиологическими группами (молочнокислыми, гнилостными бактериями и дрожжами), но в меньшем количестве. Максимальное количество микроорганизмов в подвяленном материале выявляется до 15 суток (в силосе до 7). В сенаже меньше органических кислот, больше сахара, а его кислотность, как правило, ниже кислотности силоса. [6]

Биологической основой приготовления сенажа является ограничение остаточного дыхания растительных клеток и нежелательных микроорганизмов путем «физиологической сухости». Водоудерживающая сила в сенаже равна примерно 50 атм., а осмотическое давление у большинства бактерий составляет 50-52 атм., т.е. при влажности травы 40-55% вода находится в малодоступной для большинства бактерий форме. Благодаря повышенному осмотическому давлению в сенажной массе маслянокислые бактерии и их споры не могут использовать влагу корма для своего развития и прорастания. Плесени могут развиваться с указанной влажностью,

но их существование затруднено из-за отсутствия воздуха (кислорода).

Осмолерантные виды молочнокислых бактерий могут развиваться при такой влажности. У культур молочнокислых бактерий сенажа осмотическая активность, активность размножения, накопление молочной кислоты, а также способность сбраживать сложные углеводы (крахмал и др.) выше, чем у культур молочнокислых бактерий силоса. [7]. Поэтому как и при силосовании должны создаваться оптимальные условия для развития молочнокислых бактерий (непрерывное уплотнение во время закладки и герметичное укрытие полиэтиленовой пленкой для ограничения доступа воздуха). Если же хранилище недостаточно уплотнено и негерметично это приводит к разогреванию, плесневению корма и другим нежелательным аэробным процессам. В таких условиях сенаж хорошего качества приготовить нельзя. В результате процессов самосогревания резко снижаются переваримость питательных веществ, особенно протеина. Технология заготовки сенажа и силоса из трав с пониженной влажностью детально изложены во многих книгах и руководствах, мы лишь подчеркнем здесь, что при соблюдении основных технологических приемов питательность сенажа выше питательности силоса, приготовленного из корма естественной или пониженной влажности. В 1 кг натурального корма содержится 0,30-0,35 корм.ед.

1.4. Микрофлора сена и влажного зерна.

Теоретически приготовление сена связано с высушиванием культуры с первоначального содержания воды 65-75% до ее содержания 10-16%, при котором прекращается вся биохимическая и микробиологическая деятельность. На практике сено не высушивается до такого низкого содержания воды и фактически считают безопасным хранить сено после того, как среднее содержание воды в нем снизилось до 20%. Это достаточно высокая влажность, при которой происходит плесневение, если только при хранении не происходит дальнейшей потери воды.

Во всех случаях в первые 2-3 дня хранения наблюдается первый пик температуры и за ним резко следует второй, более высокий пик. Именно второй пик обусловлен дыханием быстро развивающихся грибов. Чем выше содержание воды уровня 20%, тем сильнее возрастает опасность плесневения, увеличения потерь сухого вещества. Так, если рыхлые кипы сена хранятся при содержании воды 35-40%, потери сухого вещества будут около 15-20%, а растворимых углеводов – будут полными. Микробиологический анализ выявит большую численность микроорганизмов, включающих опасные термофильные актиномицеты (раздел 2.3.).

Термин «влажное зерно», как правило, применяется к зерну с влажностью от 18 до 20%. Влажное зерно начинает согреваться уже через несколько часов после уборки в основном за счет микроорганизмов. Если условия хранения неподходящие и не контролируются, температура зерна

будет повышаться до уровня, при котором могут успешно расти очень опасные актиномицеты, которые вызывают целый ряд различных заболеваний животных и людей (раздел 2.1.3.). Если зерно содержит более 18% воды имеют место вторичные изменения, которые обусловлены дрожжами, относящимся к родам *Candida* и *Hansenula*. Эти микроорганизмы способны расти при очень низком содержании кислорода и в этих условиях может происходить слабое спиртовое брожение. Такого рода брожение приводит к снижению содержания сахарозы и увеличению содержания восстанавливающих сахаров, образованию различных привкусов, повреждению клейковины.

2. Масштабы потерь в консервированных кормах, вызванные деятельностью микроорганизмов.

При составлении баланса кормов нужно учитывать потери при заготовке и хранении консервированных кормов. Существует много схем, показывающих, что общие потери складываются из потерь в поле, хранилищах и происходят еще во время уборки зеленой массы. В данном руководстве рассматривается величина потерь, вызванных деятельностью микроорганизмов, которые зачастую недооцениваются и при неквалифицированной работе могут достигать огромных размеров.

2.1. Потери при брожении.

После отмирания растительных клеток в заполненном и хорошо уплотненном хранилище начинается интенсивное разложение и преобразование питательных веществ размножающимися микроорганизмами. Происходят потери в результате образования бродильных газов («угар»), потерь в верхних и боковых слоях, потерь из-за вторичных процессов брожения.

Непрерывное заполнение хранилищ (силосного, сенажного) позволяет значительно снизить образование газов. При быстром заполнении хранилища потери сухого вещества вследствие «угара» могут составлять 5-9%. При растянутом заполнении соответствующие показатели могут достигать 10-13% и более. Следовательно, путем непрерывного заполнения можно сократить потери от «угара» примерно на 4-5%. Следует учитывать, что в плохо уплотненном сенаже в результате процессов самосогревания происходит снижение переваримости протеина в два раза (раздел 1.3).

Интенсивное разложение питательных веществ происходит в верхних и боковых слоях в неукрытой силосной (сенажной) массы. При укрытии одной мякиной или без укрытия потери могут быть гораздо больше. Плесневые грибы развиваясь кладут начало сильному разложению белка. Продукты распада белка имеют щелочную реакцию и связывают молочную кислоту. Происходит также прямое разложение молочной кислоты. Перечисленные процессы ведут к повышению pH и ухудшению качества

корма. Даже если в момент открытия хранилища толщина испорченного слоя не превышает 10 см, надо иметь в виду, что этот слой первоначально имел толщину 20-50 см, а силос, находящийся под испорченным слоем, характеризуется высоким рН, содержит ядовитые токсины и непригоден для скармливания.

Потери, вызванные вторичными процессами брожения могут достигать 20-25%. Установлено, что первую стадию порчи силоса вызывают именно дрожжи совместно с аэробными бактериями, связанную с его разогреванием, снижением кислотности. При второй стадии порчи силоса происходит последующее заражение плесенью. Такой корм считается непригодным в том случае, если в нем содержится более $5 \cdot 10^5$ грибов. Уже после 5-дневного аэробного хранения в случае длительного скармливания или неправильной выемки из хранилища кукурузный силос даже с хорошим начальным рН 4,1, но уже имеющим $3 \cdot 10^7$ дрожжей имеет астрономически высокое число дрожжей и плесеней *Streptomyceten*.

2.2. Влияние кислого силоса на обмен веществ животных и качество молочных продуктов.

С силосом за сутки в организм животного вводится 0,7-0,9 кг органических кислот, которые оказывают существенное влияние на процессы пищеварения и обмен веществ. Скармливание перекисшего (кукурузного) силоса может привести к нарушению уровня сахара, щелочного резерва в крови, развитию кетозов. При этом кетонемия в организме высокопродуктивных коров развивается быстрее, чем у низкопродуктивных.

Длительное скармливание коровам по 25-30 кг в сутки силоса спонтанного брожения отрицательно отражается на воспроизводительной способности коров, биологической полноценности молозива и молока, что ведет к снижению роста телят и их сопротивляемости к желудочно-кишечным заболеваниям.

Если силос перекислен, он оказывает отрицательное влияние на вкусовые и технологические качества молока при его переработке в масло и сыры, ухудшает качество сливочного масла.

В настоящее время разработаны способы анаэробного раскисления перекисающих силосов из кукурузы с помощью заквасок на основе пропионовокислых бактерий и химических препаратов (углеаммонийные соли).

2.3. Кормовые токсикозы.

Известно, что животные поедают плесневое сено крайне неохотно или вовсе не едят его. Непригоден в качестве корма также плесневелый силос и сенаж. Ядовитые токсины, выделяемые некоторыми культурами грибов, обнаруживаются в силосе из наземных буртов и земляных силосохранилищах или в верхних слоях кормовой массы крупных силосных

траншей при плохом уплотнении и негерметичном укрытии свежескошенной и особенно подвяленной массы. Имеются весомые медицинские свидетельства о том, что отмечаются легочные заболевания животных и работников, имеющих дело с плесневелым сеном и зерном. И у людей и животных они вызываются вдыханием термофильных микроорганизмов (*Microsporida*, *Thermoactinomyces*, *Aspergillus*).

Имеются многие другие потенциально опасные плесени, способные вызывать целый ряд микотоксикозов, в т.ч. снижение плодовитости, абортирование и общее ухудшение здоровья. Все эти заболевания вызываются микотоксинами, вырабатываемыми грибами *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* (афлатоксины, цераленон, охратоксин).

3. Микробиологический анализ кормов.

Бактерии и грибы играют большую роль в консервировании кормовых растений, участвуя не только в процессах приготовления силоса, сенажа, но вызывая ферментацию влажного зерна, сена в стогах. Общее положительное влияние активности молочнокислых бактерий выражается, прежде всего, в разложении сложных органических веществ на более простые формы и образовании чаще всего органических кислот и витаминов. Однако, при неблагоприятных условиях консервирования (нарушении основных технологических приемов и т. д.) могут иметь место отрицательные последствия по причине нежелательных процессов. Хороший силос, сенаж и сено, к примеру, должны быть свободны от плесневого мицелия и плесневого запаха. Появление плесени при органолептической оценке служит признаком плохого качества растительных кормов, так как представляет угрозу для здоровья животных, людей. Такой корм должен выбраковываться или подвергаться ветеринарно-токсикологическому исследованию. [3]

Насколько важна микробиологическая оценка качества корма наряду с биохимическими анализами очевидно со следующего примера. При созревании сыра обнаружилось нежелательное “вспучивание” из-за образования газов, несмотря на то, что в скармливаемом коровами силосе масляная кислота отсутствовала. В результате микробиологического анализа был выявлен высокий титр маслянокислых бактерий, которые долгое время сохранялись в силосе в виде спор и лишь попав в благоприятные условия они развивались из спор. Силос, содержащий споры маслянокислых бактерий, способствовал бактериальному заражению молока. Такое молоко характеризовалось плохой устойчивостью. При хранении было совершенно непригодно для приготовления сыров. Поэтому иногда в некоторых сыродельческих районах ошибочно считают скармливание силоса нецелесообразным. Благодаря применению микробиологического анализа в сочетании с образцовой дезинфекцией донльных установок достигается улучшение качества молока.

3.1. Основные микробиологические методы определения качества кормов.

1. Подготовка исследуемого материала (суспензии корма) к анализу.

Среднюю пробу (весом 0,5-1,0 кг) исследуемого материала (силоса или сенажа) тщательно перемешивают (с соблюдением основных правил асептики) и измельчают на кусочки длиной 1-2 см. Затем навеску (50 г) хорошо перемешанной средней пробы помещают в стерильный гомогенизатор марки M.S.E. Ato-pux, добавляют 450 мл стерильной водопроводной воды и в течение 1 минуты гомогенизируют. Полученную суспензию разбавляют до 10^5 - 10^6 раз стерильной водопроводной водой (5 мл суспензии + 45 мл воды), взбалтывают каждое разведение в течение 5 минут.

2. Высев суспензии на элективные среды (приложение 1) проводят по 1 мл суспензии – при глубинном посеве, по 0,05-0,1 мл суспензии при посеве в жидкие среды.

3. Определение количества молочнокислых бактерий проводят на капустном агаре с мелом (среда 1) и на капустном агаре со спиртом и мелом (среда 2) – глубинный посев.

Подсчет колоний молочнокислых бактерий на капустном агаре с мелом проводят на 5-6 день, а на капустном агаре со спиртом и мелом – на 7-10 день (при 28°).

Среда 2 необходима для выявления молочнокислых бактерий в составе эпифитной микрофлоры и свежих (с высоким содержанием сухого вещества) силосов, так как спирт заметно тормозит рост посторонней микрофлоры.

4. Количество посторонней микрофлоры (аэробных гнилостных микроорганизмов) определяют глубинным посевом на пептонном агаре (среда 3). Подсчет колоний ведется на 5-7 день при 28°.

5. Количество спор аэробных гнилостных бактерий на специальной среде (мясопептонный агар + сусло-агар) – среда 8. Посев поверхностный (0,05мл), подсчет колоний ведут на 4 день (при 28°).

6. Количество микроскопических грибов и дрожжей определяют на сусло-агаре со стрептомицином (среда 4) поверхностным посевом (0,1 мл). Подсчет колоний ведут на 3-4 день (при необходимости повторно на 7-8 день) при 28°.

7. Титр маслянокислых бактерий устанавливают на жидкой картофельной среде (среда 5). Для определения количества спор маслянокислых бактерий проводят посев из суспензии после пастеризации в течение 10 минут при 75°.

Учет результатов анализа ведут по интенсивности и выделения газа (кусочки картофеля всплывают на поверхность жидкости), титр маслянокислых бактерий и их спор устанавливают по методу предельных разведе-

ний.

8. Анаэробные протеолитические бактерии определяют на мясо-пептонном бульоне (среда 6) по выделению газа в поплавах. Посевы выдерживаются при 28° в течение двух недель.

9. Денитрифицирующие бактерии учитывают на среде Гильята (среда 7) при анализе корма из трав, выращенных по фону высоких доз азотных удобрений. Подсчет ведется по интенсивности выделения газа и посевы выдерживают в течение 10-12 дней при 28°.

10. Тест микробиологического роста.

Для определения фунгистатических (фунгицидных), бактериостатических (бактерицидных) свойств соединений две пробирки (в трех повторностях) с элективной средой, в одной из которых добавлен изучаемый препарат, засеваются тест-культурой. Из пробирки с культурой, где после добавления того или иного ингибирующего препарата не наблюдалось роста, переносится петля на свежую среду (не содержащую препарата). Если через 24 часа начинается усиленный рост, изучаемый препарат обладает фунгистатическим, бактериостатическим (тормозящим) действием. Если через неделю роста не наблюдается делается вывод о фунгицидном, бактерицидном (ингибирующим) действии изучаемого вещества (приложение 2).

В качестве тест-культуры используют наиболее часто встречающиеся представители нежелательной микрофлоры (гнилостные и маслянокислые бактерии, дрожжи, плесневые грибы).

Лабораторно-практическое занятие 1

Тема: Основные микробиологические методы определения качества кормов. Выделение и учет молочнокислых бактерий.

Цель: Ознакомить студентов с основными микробиологическими методами определения качества кормов; элективными питательными средами №1 и №2; основными биологическими свойствами молочнокислых бактерий.

Время: 4 часа.

Место работы: лаборатория кафедры микробиологии и вирусологии.

Оборудование и материалы.

Рабочее место бактериолога, микроскопы, лупы, питательные среды №1 и №2 – по 2 чашки Петри. Тест-культуры молочнокислых микроорганизмов на плотной среде – *Lactobacterium plantarum*. Таблицы с рисунками молочнокислых бактерий. Термостат. Исследуемый корм (образцы силоса или сенажа). Гомогенизатор. Весы до 1 кг, разновесы. Стерильные чашки Петри – 2 шт. Стерильная водопроводная вода в 0,5 л флаконе. Пипетки 1,0; 5,0; 10,0 мл. Колбы 50,0; 100,0 мл. Бактериологические петли. Спиртовки.

Методические указания (объяснение основных вопросов темы).

Преподаватель проводит теоретический опрос по теме: «Микробиология силоса и сенажа».

Затем преподаватель дает краткую характеристику микроорганизмам кормов, объясняет микробиологические процессы, происходящие при силосовании и сенажировании.

Далее дает краткую характеристику представителям микрофлоры кормов – эпифитной микрофлоре растений, молочнокислым, маслянокислым и гнилостным бактериям, плесневелым грибам и дрожжам, обращая внимание студентов на морфологию колоний молочнокислых бактерий. Затем преподаватель обращает внимание студентов на масштабы потерь в консервированных кормах, вызванных деятельностью нежелательных микроорганизмов.

Преподаватель дает объяснение понятиям «микозы», «микотоксикозы» (кормовые токсикозы), а также рассказывает о влиянии силоса на обмен веществ животных.

Затем преподаватель знакомит студентов с ингредиентами элективных питательных сред №1 и №2 и назначением этих сред для культивирования молочнокислых групп микроорганизмов. Одновременно с объяснением преподаватель демонстрирует посев суспензии корма на питательные среды.

Методика выявления и учета молочнокислых бактерий.

1. Подготовка исследуемого материала к анализу.

Среднюю пробу (весом 0,5-1,0 кг) исследуемого материала (силоса или сенажа) тщательно перемешивают (с соблюдением основных правил асептики) и измельчают на кусочки длиной 1-2 см. Затем навеску (50 г) хорошо перемешанной средней пробы помещают в стерильный гомогенизатор марки типа M.S.E. Ato-mix, добавляют 450 мл стерильной водопроводной воды и в течение 1 минуты гомогенизируют. Полученную суспензию разбавляют до 10^5 - 10^6 раз стерильной водопроводной водой (5 мл суспензии + 45 мл воды), взбалтывают каждое разведение в течение 5 минут.

2. Высев суспензии на элективные среды (приложение) проводится по 1 мл суспензии – при глубинном посеве, по 0,05-0,1 мл суспензии при посеве в жидкие среды.

3. Определение количества молочнокислых бактерий проводят на капустном агаре с мелом (среда 1) и на капустном агаре со спиртом и мелом (среда 2) – глубинный посев.

Подсчет колоний молочнокислых бактерий на капустном агаре с мелом проводится на 5-6 день, а на капустном агаре со спиртом и мелом – на 7-10 день (при 28°).

Среда 2 необходима для выявления молочнокислых бактерий в составе эпифитной микрофлоры и свежих (с высоким содержанием сухого

вещества) силосов, так как спирт заметно тормозит рост посторонней микрофлоры.

Посевы ставят в термостат при 28°C на 5-10 суток.

Самостоятельная работа студентов.

1. Студенты записывают в тетрадь из таблицы морфологию молочнокислых бактерий, в т.ч. характер роста колоний, рецепты питательных сред.

2. На последующем занятии проводят подсчет колоний на среде №1 на 5-6 день, а на среде №2 – на 7-10 день.

Контрольные вопросы.

1. Какая микрофлора называется эпифитной?

2. Какие микроорганизмы относят к молочнокислым? Какова их роль при силосовании?

3. Методы выделения и учета молочнокислых бактерий.

Подведение итогов занятия:

Выставление оценок по теоретической части, прием выполненной практической работы, изложение замечаний.

Домашнее задание.

1. Микробиология кормов (силоса и сенажа).

2. Маслянокислое брожение.

Литература.

1. [2] С.124-135; С.267-293

2. [3] 215с.

3. [4] 621с.

4. [5] 346с.

5. [6] С.448-452

6. [7] С.429-453

Лабораторно-практическое занятие 2.

Тема: Основные микробиологические методы определения качества кормов. Выделение и учет маслянокислых бактерий.

Цель: Ознакомить студентов с основными методами определения качества кормов; рецептом приготовления элективной питательной среды №5; основными биологическими свойствами маслянокислых бактерий.

Время : 4 часа.

Место работы: лаборатория кафедры микробиологии и вирусологии.

Оборудование и материалы.

Рабочее место бактериолога, микроскопы, лупы, питательная среда №5 в количестве 4 пробирок. Тест-культуры маслянокислых бактерий в

жидкой среде – *Clostridium butyricum*; предварительно выполненные посе-
вы тест-культуры на среде №5 (по 4 пробирки). Таблицы с рисунками
маслянокислых бактерий. Термостат. Исследуемый корм (образцы силоса
или сенажа). Гомогенизатор. Весы до 1 кг, разновесы. Стерильные Петри
– 4 шт. Стерильная водопроводная вода в 0,5 л флаконе. Пипетки 1,0; 5,0;
10,0 мл. Колбы 50,0; 100,0 мл. Бактериологические петли. Спиртовки.

Методические указания (объяснение основных вопросов темы).

Преподаватель проводит теоретический опрос по теме: «Микробио-
логия силоса и сенажа», в т.ч. о морфологии и роли маслянокислых бакте-
рий в процессе силосования и сенажирования.

Затем преподаватель объясняет биологические свойства масляно-
кислых бактерий и особенности культуральных свойств. Обращает вни-
мание студентов на рост маслянокислых бактерий в жидкой среде с целью
дальнейшего учета вегетативных клеток и их спор.

После объяснения преподаватель демонстрирует методику опреде-
ления титра маслянокислых бактерий и учета спор по методу предельных
разведений.

Методика определения титра маслянокислых бактерий.

Титр маслянокислых бактерий устанавливают на жидкой карто-
фельной среде (среда 5). Для определения количества спор маслянокис-
лых бактерий проводят посев из суспензии после пастеризации в течение
10 минут при 75°.

Учет результатов анализа ведут по интенсивности и выделения газа
(кусочки картофеля всплывают на поверхность жидкости), титр масляно-
кислых бактерий и их спор устанавливают по методу предельных разведе-
ний.

Посевы ставят в термостат при 28°С на 5-7 суток.

Самостоятельная работа студентов.

1. Студенты записывают в тетрадь из таблицы морфологию масляно-
кислых бактерий *Clostridium butyricum*, рецепты питательной среды №5.

2. На последующем занятии проводят через 5-7 дней культивирова-
ния учет результатов роста маслянокислых бактерий по интенсивности
выделения газов (кусочки картофеля всплывают на поверхность среды).

3. Далее на занятии проводят учет спор маслянокислых бактерий по
методу предельных разведений Мак-Креди [3].

Контрольные вопросы.

1. Какие микроорганизмы относятся к возбудителям маслянокисло-
го брожения?

2. Основные биологические свойства *Clostridium butyricum*.

3. Роль маслянокислых бактерий при сенажировании и силосовании.

4. Методы выделения маслянокислых бактерий и учета спор.

Подведение итогов занятия.

Выставление оценок по теоретической части; прием выполнения

практической части; изложение замечаний.

Домашнее задание.

1. Микробиология силоса и сенажа
2. Гнилостное брожение.

Литература.

1. [2] С.124-135; С.267-293
2. [4] 621с.
3. [5] 346с.
4. [8] 191с.

Лабораторно-практическое занятие 3.

Тема: Основные микробиологические методы определения качества кормов. Выделение и учет аэробных гнилостных микроорганизмов.

Цель: Ознакомить студентов с основными микробиологическими методами определения качества кормов; элективными питательными средами №3 и №8 ; основными биологическими свойствами аэробных гнилостных микроорганизмов.

Время : 4 часа.

Место работы: лаборатория кафедры микробиологии и вирусологии.

Оборудование и материалы.

Рабочее место бактериолога, микроскопы, лупы, питательные среды №3 и №8 в чашках Петри (по 4 чашки). Тест-культуры микроорганизмов на плотной среде – *Bacillus mesentericus* (картофельная бацилла); предварительно выполненные посевы тест-культуры на средах №3 и №8 по 4 комплекта). Таблицы с рисунками гнилостных микроорганизмов. Термостат. Исследуемый корм (образцы силоса или сенажа). Гомогенизатор. Весы до 1 кг, разновесы. Стерильные Петри – 4 шт. Стерильная водопроводная вода в 0,5 л флаконе. Пипетки 1,0; 5,0; 10,0 мл. Колбы 50,0; 100,0 мл. Бактериологические петли. Спиртовки.

Методические указания (объяснение основных вопросов темы).

Преподаватель проводит теоретический опрос по теме: «Микробиология силоса и сенажа».

Затем преподаватель дает краткую характеристику микроорганизмов кормов, участвующих в сенажировании и силосовании, при этом обращая внимание студентов на биологические свойства аэробных гнилостных (протеолитических) микроорганизмов; о различии гнилостных бактерий (аэробов) с маслянокислыми (анаэробами).

Преподаватель знакомит студентов с ингредиентами элективных питательных сред №3 и №8 для культивирования протеолитических

микробов. Одновременно с объяснением преподаватель демонстрирует посев суспензии корма на питательные среды.

Методика выявления количества аэробных протеолитических микроорганизмов.

Количество посторонней микрофлоры (аэробных гнилостных микроорганизмов) определяется глубинным посевом на пептонном агаре (среда 3). Подсчет колоний ведется на 5-7 день при 28°.

Количество спор аэробных гнилостных бактерий на специальной среде (мясопептонный агар + сусло-агар) – среда 8. Посев поверхностный (0,05мл), подсчет колоний ведут на 4 день (при 28°).

Посевы ставят в термостат при 28°С на 4-7 суток.

Самостоятельная работа студентов.

1. Студенты записывают в тетрадь из таблицы морфологию гнилостных (протеолитических) микроорганизмов - *Bacillus mesentericus*; рецепты питательных сред.

2. На последующем занятии проводят через 4-7 дней культивирования учет результатов роста гнилостных бактерий путем подсчета колоний при 28°С.

Контрольные вопросы.

1. Характеристика гнилостных аэробных микроорганизмов
2. В чем сходство и различие гнилостных бактерий с возбудителями маслянокислого брожения?
3. Влияние протеолитических бактерий на качественные показатели готового силоса и сенажа.

Подведение итогов занятия.

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

Домашнее задание

1. Микробиология кормов.
2. Спиртовое брожение.

Литература.

1. [2] С.124-135; С.267-293
2. [1] С.63-67
3. [5] 346с.

Лабораторно-практическое занятие 4.

Тема: Основные микробиологические методы определения качества кормов. Выделение и учет количества микроскопических грибов и дрожжей.

Цель: Ознакомить студентов с основными микробиологическими методами определения качества кормов; элективными питательными

средами №4; основными биологическими свойствами плесневых грибов и дрожжей.

Время : 4 часа.

Место работы: лаборатория кафедры микробиологии и вирусологии.

Оборудование и материалы.

Рабочее место бактериолога, микроскопы, лупы, питательная среда №4 в чашках Петри (по 4 чашки). Тест-культуры дрожжей – *Hansenula anomala* и плесневых грибов *Penicillium notatum*; предварительно выполненные посевы тест-микроорганизмов на среде №4 на чашках Петри (по 4 чашки). Таблицы с рисунками плесневых грибов и дрожжей. Термостат. Исследуемый корм (образцы силоса или сенажа). Гомогенизатор. Весы до 1 кг, разновесы. Стерильные Петри – 4 шт. Стерильная водопроводная вода в 0,5 л флаконе. Пипетки 1,0; 5,0; 10,0 мл. Колбы 50,0; 100,0 мл. Бактериологические петли. Спиртовки.

Методические указания (объяснение основных вопросов темы).

Преподаватель проводит теоретический опрос по теме: «Микробиология силоса, сенажа, сена и влажного зерна».

Затем преподаватель дает краткую характеристику микроскопическим плесневым грибам и дрожжам и их роли в аэробной порче кормов. Далее преподаватель обращает внимание на физиолого-биохимические особенности грибов: на факторы, ограничивающие их развитие; знакомит с ингредиентами питательной среды №4. Одновременно с объяснением преподаватель демонстрирует посев суспензии корма на питательную среду №4.

Методика выявления количества аэробных протеолитических микроорганизмов.

Количество микроскопических грибов и дрожжей определяют на сусло-агаре со стрептомицином (среда 4) поверхностным посевом (0,1 мл). Подсчет колоний ведут на 3-4 день (при необходимости повторно на 7-8 день).

Посевы ставят в термостат на 7-8 дней при 28°C.

Самостоятельная работа студентов.

1. Студенты записывают в тетрадь из таблицы морфологию плесневых грибов и дрожжей, рецепты питательных сред.
2. На последующем занятии проводят учет (через 7-8 дней культивирования) результатов роста плесневых грибов и дрожжей.

Контрольные вопросы.

1. Характеристика возбудителей спиртового брожения.
2. Роль грибов в аэробной порче кормов.
3. Факторы, ограничивающие развитие микроспор грибов и дрожжей.

Подведение итогов занятия.

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

Домашнее задание

1. Микробиология кормов.
2. Превращение микроорганизмами соединений азота.

Литература.

1. [2] С.124-135; С.267-293
2. [4] 621с.
3. [5] 346с.
4. [8] 191с.

Лабораторно-практическое занятие 5.

Тема: Основные микробиологические методы определения качества кормов. Выделение и учет анаэробных протеолитических и денитрифицирующих бактерий.

Цель: Ознакомить студентов с основными микробиологическими методами определения качества кормов; элективными питательными средами №6 и №7; основными морфологическими свойствами анаэробных протеолитических и денитрифицирующих бактерий.

Время : 4 часа.

Место работы: лаборатория кафедры микробиологии и вирусологии.

Оборудование и материалы.

Рабочее место бактериолога, микроскопы, лупы, питательные среды №6 и №7 в чашках Петри (по 4 чашки). Тест-культуры анаэробных протеолитических бактерий – *Clostridium perfringens* (патогенный) или *Clostridium putrificum* (непатогенный); тест-культуры денитрифицирующих бактерий- *Pseudomonas fluorescens*; предварительно выполненные посевы кластридий и псевдомонад на питательных средах №6 и №7 (по 4 комплекта). Таблицы с рисунками анаэробных протеолитических и денитрифицирующих бактерий. Термостат. Исследуемый корм (образцы силоса или сенажа). Гомогенизатор. Весы до 1 кг, разновесы. Стерильные Петри – 4 шт. Стерильная водопроводная вода в 0,5 л флаконе. Пипетки 1,0; 5,0; 10,0 мл. Колбы 50,0; 100,0 мл. Бактериологические петли. Спиртовки.

Методические указания (объяснение основных вопросов темы).

Преподаватель проводит теоретический опрос по теме: «Микробиология силоса и сенажа»; затем дает краткую характеристику протеолитическим и денитрифицирующим бактериям, их роли в превращении соединений азота. Далее преподаватель обращает внимание на значение денитрифицирующих бактерий в превращении нитратов в нитриты и нежелательного присутствия анаэробных протеолитических бактерий при сило-

совании.

Одновременно с объяснением преподаватель демонстрирует посев суспензии корма в пробирках с поплавками на жидкие питательные среды №6 и №7.

Методика выявления анаэробных протеолитических бактерий.

Делают посев суспензии корма на мясопептонный бульон (среда №6), посеvy выдерживают при 28°C в термостате в течение 2-х недель. Результат учитывают по выделению газа в поплавках.

Методика выявления денитрифицирующих бактерий.

Проводят посев суспензии корма на среду №7. Высевы выдерживают при 28°C в термостате в течение 10-12 дней. Результат учитывают по интенсивности выделения газа в поплавках.

Самостоятельная работа студентов.

1. Студенты записывают в тетрадь из таблицы морфологию клостридий и псевдомонад, рецепты питательных сред №6 и №7.
2. На последующем занятии проводят учет через 10-12 дней культивирования при 28°C результатов роста микроорганизмов.

Контрольные вопросы.

1. Дать определение понятию «денитрификация», охарактеризовать возбудителей этого процесса.
2. Как сказывается деятельность анаэробных протеолитических бактерий на качество силоса?
3. Методы ограничения роста нежелательных протеолитических бактерий.

Подведение итогов занятия:

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

Домашнее задание.

1. Микробиология кормов.
2. Препараты, подавляющие (ингибирующие) нежелательные процессы брожения в кормах.

Литература.

1. [2] С.124-135; С.267-293
2. [4] 621с.
3. [8] 191с.

Лабораторно-практическое занятие 6.

Тема: Основные микробиологические методы определения качества кормов. Определение фунгистатических и фунгицидных, бактериостатических и бактерицидных свойств основных консервирующих препаратов.

Цель: Ознакомить студентов с основными микробиологическими методами определения и улучшения качества кормов с помощью консервирующих препаратов; определить их ингибирующее действие на бактерии и грибы.

Время : 2 часа.

Место работы: лаборатория кафедры микробиологии и вирусологии.

Оборудование и материалы.

Рабочее место бактериолога: микроскопы, лупы, спиртовки, термостат, стерильные пробирки – 12 шт; чашках Петри - 10 шт.; бактериологические петли; тест-культуры микроорганизмов:

молочнокислые микроорганизмы – *Lactobacterium plantarum*;

азобные гнилостные микроорганизмы - *Bacillus mesentericus*;

микроскопические грибы и дрожжи - *Hansenula anomala* и плесневые грибы *Penicillium notatum*;

маслянокислые бактерии – *Clostridium butyricum*;

денитрифицирующие бактерии- *Pseudomonas fluorescens*;

таблицы «Действие консервирующих веществ на бактерии и грибы»;

консерванты: пропионовая кислота, бензойная кислота, нитрит натрия,

бензоат натрия – по 10 мл (гр) каждого.

Предварительно выполненные посевы тест-культур на элективных питательных средах.

Методические указания (объяснение основных вопросов темы).

Преподаватель проводит теоретический опрос по микрофлоре кормов и консервантам, ингибирующих рост нежелательных бактерий в кормах в процессе его заготовки и хранения.

Затем преподаватель объясняет сущность теста микробиологического роста с последующей демонстрацией.

Методика теста микробиологического роста.

Для определения фунгистатических (фунгицидных), бактериостатических (бактерицидных) свойств соединений две пробирки (в трех повторностях) с элективной средой, в одной из которых добавлен изучаемый препарат, засеваются тест-культурой. Из пробирки с культурой, где после добавления того или иного ингибирующего препарата не наблюдалось роста, переносится петля на свежую среду (не содержащую препарата). Если через 24 часа начинается усиленный рост, изучаемый препарат обладает фунгистатическим, бактериостатическим (тормозящим) действием. Если через неделю роста не наблюдается, делается вывод о фунгицидном, бактерицидном (ингибирующем) действии изучаемого вещества.

Самостоятельная работа студентов.

1. Студенты конспектируют в тетради методику постановки теста микробиологического роста; рецепты питательных сред; таблицу «Действие консервирующих веществ на бактерии и грибы» (приложение 2).

Контрольные вопросы.

1. Дать определение понятиям бактерицидное и бактериостатическое, фунгицидное и фунгистатическое действие консервантов на микроорганизмы.

2. Какие основные консерванты для ограничения роста нежелательных микроорганизмов и их дозы?

3. Основные методы изучения ингибирующего действия консервантов.

Подведение итогов занятия:

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

Приложение 1

Состав элективных сред.

Среда 1 Капустный агар с мелом

Капустный бульон	900 мл
Дрожжевой экстракт	100 мл
Пептон	10 мл
Глюкоза	20 г
Ацетат натрия	3,35 г
Марганец сернокислый	0,025 г
Агар	15-20 г

Стерильный мел добавляют в колбы из расчета 1 г на 200 мл среды. Стерилизуют 30 минут при 0,5 атм.

Среда 2 Капустный агар со спиртом и мелом

В расплавленную и охлажденную до 50° среду прибавляют 20 мл этилового спирта (96%) на 200 мл среды, тщательно взбалтывают и заливают в чашки Петри с посевным материалом.

Среда 3 Пептонный агар

Пептон	5 г
K ₂ HPO ₄	1 г
K ₃ PO ₄	0,5 г
MgSO ₄	0,5 г
NaCl	следы
Водопроводная вода	1 л

Агар, хорошо промытый 15-20 г
Стерилизация при 1 атм. 20 минут.

Среда 4 Сусло-агар со стрептомицином

Сусло, разбавленное до 3% по Баллингу	1 л
Агар	15-20 г

Стерилизовать 30 минут при 0,5 атм.

Перед разливкой среды в чашки Петри, в сусло-агар добавляют 80-100 ед. стрептомицина на каждый мл среды.

Среда 5 Картофельная среда с мелом

В пробирки вносят стерильный мел (на кончике скальпеля и картофельные кубики величиной 2-3 мм (8-10 шт.), заливают водопроводной водой до $\frac{3}{4}$ объема пробирок. Стерилизуют 30 минут при 1 атм.

Среда 6 Мясопептонный бульон

Пептон	10 г
NaCl	5 г
Мясной бульон	1 г

Заливают в пробирки с поплавками до $\frac{3}{4}$ объема. Стерилизуют 20 минут при 1 атм.

Среда 7 Среда Гильтая (видоизмененная)

Лимоннокислый натрий 2 г	
KNO ₃	1 г
KH ₂ PO ₄	1 г
K ₂ HPO ₄	1 г
MgSO ₄	2 г
CaCl ₂	0,2 г
FeCl ₃	следы
Дистиллированная вода	1 л
1% раствор бром тимолблама (рН 6,8-7,0)	

Стерилизуют при 1 атм. 20 минут.

Среда 8 Мясопептонный агар и сусло-агар 1:1

Стерилизовать при 0,5 атм. 30 минут.

Действие консервирующих веществ на дрожжи.

Консервирующие вещества	Фунги-статическое действие	Фунгицидное действие	Ингибирующая доза у дрожжей pH 4,0%	Ингибирующее действие		Распад при брожении
				pH 6,0	pH 4,5	
Пропионовая кислота	+	-	0,25-0,60	0	+	0
Уксусная кислота	+	-	>0,5	0	+	0
Бензоат натрия	+	+	0,08	0	+	0
Нитрит натрия	+	+	0,010	+	+	+++
Формат кальция	+	-	>0,5	+	+	0(+)
Гексаметилен тетрамин	+	+	0,025	+	+	+++

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абраскова С. В. Влияние химических консервантов на развитие дрожжей вида *Hansenula anomala* // Научные основы развития животноводства в БССР – Минск.: Ураджай, 1984. – Вып. 14. – С.63-67.
2. Асонов Н.Р. Микробиология: Учебник для студентов высш. уч. зав. – 4-е издание перераб. и доп. – М. Колос. 2001 -352с.
3. Руководство к практическим занятиям по микробиологии: Практическое пособие /Под ред. Н. С. Егорова. – 2-е изд. – М., 1983. – 215 с.
4. Уотсон С. Дж., Нэш М. Дж. Приготовление и использование сена и силоса. – М., 1964. – 621 с.
5. Шмидт В., Веттерау Г. Производство силоса. – М.: Колос, 1975. – 346 с.
6. Федулina Н. Н. Изменение микрофлоры и биохимических показателей при консервировании сырья пониженной влажности // Пути интенсификации кормопроизводства: Науч. тр. – М., 1974. – С.448-452.
7. Федулina Н. Н. Чистякова Л. П. Физиолого-биохимические свойства молочнокислых бактерий сенажа // С.-х. биология.- 1975. – Т.Х, №3 – С. 429-433.
8. Чуканов Н. К., Попенко А. К. Микробиология консервирования трудносилосуемых растений. -Алма-Ата: Наука, 1986. – 191 с.

СОДЕРЖАНИЕ

	Введение.....	3
1	Краткая характеристика микроорганизмов кормов	4
1.1.	Эпифитная микрофлора растений, ее состав и особенности.....	4
1.2.	Микробиологические процессы, происходящие при силосовании.....	4
1.2.1.	Молочнокислые бактерии.....	6
1.2.2.	Маслянокислые бактерии.....	9
1.2.3.	Гниlostные бактерии.....	12
1.2.4.	Плесневые грибы и дрожжи.....	13
1.3.	Микробиологические процессы, происходящие при созревании сенажа.....	15
1.4.	Микрофлора сена и влажного зерна.....	16
2.	Масштабы потерь в консервированных кормах, вызванные деятельностью микроорганизмов	17
2.1.	Потери при брожении.....	17
2.2.	Влияние силоса на обмен веществ животных и качество молочных продуктов.....	18
2.3.	Кормовые токсикозы.....	18
3.	Микробиологический анализ кормов	19
3.1.	Основные микробиологические методы определения качества кормов.....	20
	Приложение.....	33
	Список литературы.....	33