

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 КУКУРУЗНОГО СИЛОСА

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

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»

Ганущенко Олег Федорович, кандидат с.-х. наук, доцент УО «ВГАВМ»

Рецензенты: доктор вет. наук, профессор кафедры микробиологии и вирусологии **Солонеско А.А.**

кандидат с.х.н., доцент кафедры кормопроизводства **Шагалеев Ф.Ф.**

кандидат вет. наук, доцент, зав. кафедрой болезней мелких животных и птиц **Зелютков 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

Применяемые ныне в производственных условиях способы заготовки и хранения кукурузного силоса не обеспечивают получение высокоэнергетического корма. Зачастую даже раннеспелые гибриды не успевают достичь оптимальных для силосования стадий развития (молочно-восковая, восковая спелость зерна) из-за климатических условий, особенно в северной части Беларуси. Высокая влажность исходной зеленой массы и относительно большое содержание сахара приводят, как показывает практика, к получению перекисшего корма (рН 3,3-3,7) с низкой питательностью (0,12-0,14 корм. ед. в 1 кг корма). Такой силос является причиной нарушения обмена веществ у животных.

Кроме того, вызывает озабоченность ухудшение аэробной стабильности кукурузного силоса хорошего качества. В этом случае наблюдаются значительные потери в процессе выемки кукурузного силоса из хранилища, несмотря на строгое соблюдение основных технологических приемов при его заготовке (снижение влажности, своевременная закладка, надежное уплотнение и укрытие). Это происходит в результате активности аэробной микрофлоры, которая использует в качестве источника энергии водорастворимые углеводы и молочную кислоту. На практике это сопровождается термическим процессом, в конечном счете, "аэробным разложением" силоса, от которого отказываются животные.

В данном пособии рассматриваются особенности процессов брожения при созревании кукурузного силоса, способы раскисления перекисших силосов из кукурузы, а также факторы, повышающие их аэробную стабильность.

Учебно-методическое пособие рассчитано на 6 часов лекций и 18 часов лабораторно-практических занятий.

1. Микрофлора зеленой массы и силосованной кукурузы.

1.1. Микрофлора зеленой массы кукурузы.

Исследование микрофлоры свежей зеленой массы кукурузы и початков во время заготовки силоса показали, что её представители, участвующие в процессах созревания силосованных кормов, выявляются примерно в таком же численном соотношении, как и на других видах свежего сырья для силосования. При анализе количественного и качественного состава микрофлоры кукурузы установлено преобладающее количество гнилостных бактерий - *Bacillus megaterium*, *Bacterium levans*, *Pseudomonas herbicola levans* (табл.1. Выявляется большое количество дрожжей – *Hansenula anomala*, *Candida krusei*, *Pichia membranae faciens*, *Saecharomyces exiguus*, а также плесневых грибов *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium sporotrichiella*, *Geotrichum candidum* и др. Основными представителями молочнокислых бактерий кукурузы явились палочковидные формы типа *Lactobacillus plantarum*.

Микрофлора свежесобранных початков значительно беднее микрофлоры зеленой массы, снятой в тот же срок и в том же поле. Это указывает на то, что обертка является защитным укрытием початка в отношении микрофлоры. Так в 1г обертки содержатся единицы и десятки миллионов гнилостных бактерий, в самом початке гнилостные бактерии были обнаружены в количестве десятков тысяч, а молочнокислые – сотен и тысяч клеток.

Таблица 1
Количество микроорганизмов в свежей зеленой массе кукурузы во время загрузки в хранилище, млн. кл. /г силосуемой массы

Анализируемый материал	Молочно-кислые (<i>Lact. plantarum</i>)	Гнилостные бактерии		Дрожжи (<i>Hans. anomala</i>), плесени – (<i>Asp. fumigatus</i>)	Маслянокислые
		Споровые (<i>Bac. megaterium</i>)	Неспоровые (<i>Bact. Levans</i>)		
Зеленая масса кукурузы с початками (в период молочно-восковой спелости)	3,1	13,0	1,0	0,150	0,01
Свежие початки	0,1	8,0	0,01	0,002	0,001

1.2. Микрофлора силосованной кукурузы.

Кукуруза богата углеводами, поэтому при создании анаэробных условий в процессе силосования молочнокислые бактерии довольно быстро приобретают численный перевес над гнилостными. Если на вторые сутки в кукурузном силосе молочнокислых бактерий насчитывали 430 млн., гнилостных 425 млн. в 1 г силосной массы, то через 15 суток, когда численность молочнокислых бактерий возросла до 900 млн., гнилостные бактерии выделялись в очень малом количестве. Маслянокислые бактерии при оптимальных условиях силосования не развиваются.

Наблюдение за динамикой процессов созревания силоса из кукурузы показало, что в первой фазе участвуют не только гнилостные и молочнокислые бактерии, но и дрожжи. Их количество значительно возрастает на вторые сутки.

Активность дрожжей в силосе считается нежелательной по двум причинам.

Во-первых, они конкурируют с молочнокислыми бактериями за сахара, которые сбраживают в основном до этилового спирта, не представляющего значительной консервирующей ценности. В ходе образования этилового спирта из глюкозы сначала образуется пируват, который затем декарбоксилируется до ацетальдегида, восстанавливаемого до этилового спирта. Помимо этилового спирта, дрожжи в анаэробных условиях образуют также и другие продукты (уксусную, пропионовую, масляную, изомаляную кислоты, *n*-пропанол, изобутанол, изопентанол). В дополнение к гексозным сахарам некоторые дрожжи используют пентозы (D-ксилозу, D-рибозу), полисахариды (крахмал), спирты (маннит, сорбит).

Во-вторых, дрожжи являются основными возбудителями аэробного разложения силоса, используют органические кислоты (молочную, уксусную, лимонную (см. раздел 3.2)

Таким образом, в кукурузе богатой углеводами, при оптимальном режиме силосования, в начальный период созревания процесс брожения обусловлен преимущественным участием сообщества микроорганизмов, сбраживающих углеводы: гнилостных, молочнокислых и дрожжей. Гнилостные бактерии доминируют не более первых 2-5 суток, а затем под воздействием нарастающего количества молочнокислых бактерий, прекращают свое развитие в условиях низкого уровня pH.

Молочнокислые бактерии, достигнув доминирующего положения, почти полностью заменяют гнилостных бактерий. Затем, по мере дальнейшего снижения уровня pH, их количество снижается.

Аэробные условия в силосохранилище неблагоприятны для роста плесеней. Они, как правило, развиваются лишь на отдельных

участках, у краев и на поверхности, которые соприкасаются с воздухом.

При нарушении технологического режима силосования в кукурузной массе в наибольшей степени сказывается деятельность дрожжей и маслянокислых бактерий, т.е. микроорганизмов, разрушающих углеводы. Такой силос характеризуется большим содержанием уксусной, и даже масляной кислоты. Наличие большого количества уксусной кислоты всегда указывает на пониженное качество силоса.

1.3. Микрофлора кукурузы подмороженной заморозками.

В условиях северных районов республики бывают случаи, когда силосуют подмороженную кукурузу. При правильной технологии силосования подмороженной кукурузы уже через 3-5 суток молочнокислые бактерии приобретают доминирующее положение, их численность почти в 10 раз превышает количество гнилостных бактерий, а дрожжи на этом материале выявляются даже в большем количестве, чем в созревших силосах из неповрежденной заморозком кукурузы.

На этом материале основное экологическое сообщество микроорганизмов представлено молочнокислыми и гнилостными бактериями, а также дрожжами. Из гнилостных бактерий выделены те же виды, которые встречаются обычно при силосовании зеленой массы разнообразных растений, в том числе и кукурузы - *Pseudomonas herbicola* и *Bacterium levans*.

Биохимические данные свидетельствуют о том, что процессы созревания этих силосов характеризуется быстрым и очень высоким накоплением органических кислот. В то же время отмечено, что, по мере хранения, кислотность в этих силосах существенно снижается. Это может быть объяснено потреблением кислот дрожжами, поскольку последние здесь обнаруживаются даже в 9-месячном силосе, что приводит к получению готовых кормов пониженного качества.

Через 5 месяцев хранения качество силоса, взятого в середине хранилища и в более глубоких слоях, по составу органических кислот, по микрофлоре и органолептическим показателям было хорошим, в то время как в верхней части сооружения был получен силос плохого качества. Силос из верхнего слоя хранилища обладал острым запахом масляной кислоты и в нем были выявлены гнилостные бактерии в доминирующем количестве над молочнокислыми: соответственно 30 млн. и 23 млн. бактерий на 1 г силосной массы. Здесь же были выявлены в значительно большем количестве маслянокислые бактерии, по сравнению с силосом, залегающим на середине сооружения.

Таким образом, микробиологические процессы созревания силоса из кукурузы, поврежденной заморозком, протекают более интенсивно, чем при силосовании кукурузы, не поврежденной им; при большем

участии нежелательной микрофлоры в верхних слоях. Задержка с уборкой подмороженной кукурузы недопустима, так как это способствует быстрому развитию на подмороженных растениях нежелательной микрофлоры и существенно снижает качество готового силоса.

Поэтому кукурузу, поврежденную заморозками, необходимо быстро убрать и сразу же засилосовать с соблюдением всех технологических приемов.

2. Влияние кукурузного силоса на обмен веществ в организме животных.

За сутки в организм животного с силосом вводится 0,7-0,9 кг органических кислот, которые оказывают существенное влияние на процессы пищеварения и обмен веществ [4]. Но если силос переокислен, то количество кислот существенно возрастает. Такой силос оказывает отрицательное влияние не только на обменные процессы, но и на вкусовые, технологические качества молока, а также на продукты его переработки (сыры, масло).

Длительное скармливание кукурузного силоса спонтанного брожения в чистом виде (без других кормов) тормозит процессы брожения в рубце, угнетает развитие микрофлоры и вызывает снижение переваримости питательных веществ рациона, а также среднесуточных приростов живой массы. Животные отказываются от корма из кукурузы, в котором прошли процессы вторичного брожения.

Установлено снижение щелочного резерва и сахара в крови у коров, обильно поедавших силос спонтанного брожения.

Содержание ацетоновых тел в крови, молоке и в моче животных растет по мере увеличения количества переокисленного силоса в рационе. Скармливание лактирующим коровам по 20-25 кг кукурузного силоса, содержащего масляную кислоту, вызывало тяжелую форму ацидоза и значительно повышало кислотность молока.

Силосный тип кормления коров с недостатком в рационе легкопереваримых углеводов снижает амилолитическую активность содержимого рубца и химуса слепой кишки. Длительное скармливание коровам по 25-30 кг в сутки переокисленного кукурузного 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. Научные выводы подтвердились в практических условиях кормления коров кукурузным силосом.

Следует отметить, что кетонемия в организме высокопродуктивных коров развивается быстрее, чем у низкопродуктивных. Нарушение

соотношения углеводного и жирового метаболитов в организме приводит к появлению в крови и тканях значительного количества недоокисленных продуктов обмена в виде кетоновых (ацетоновых) тел и развитию кетоза.

Явления кетозов в организме обычно связывают с нарушением углеводно-жирового обмена веществ при одновременном снижении количества сахара в крови и резком повышении кетоновых тел. Основная причина кетозов - поступление в организм кислых продуктов обмена в периоды необычных состояний к усвоению питательных веществ рациона, т.е. беременности, лактации, стрессов и т.д. Отсюда и наибольшая предрасположенность к кетозам самок сельскохозяйственных животных, потребляющих повышенное количество силоса.

Кетонемия, независимо от причины, ее вызвавшей, характеризуется накоплением в крови и тканях кетоновых тел под влиянием активированных уксусной и ацетоуксусной кислот. Ацетоуксусная кислота превращается в оксимасляную благодаря ферменту дегидрогеназа, причем реакция эта обратима. В рубце жвачных животных обнаружена ацето-ацетатдекарбоксилаза, которая позволяет тканям рубца использовать ацетоуксусную кислоту с выделением ацетона и углекислого газа. Эти метаболиты удаляются из организма с мочой и выдыхаемым воздухом. Если, например, с выдыхаемым жвачными животными воздухом ощущается характерный запах ацетона, то это показатель заболевания кетозом.

К предшественникам кетоновых тел относятся тирозин, лейцин, изолейцин и фенилаланин, синтезируемые в рубце и поступающие с кормом. За сутки в организме коровы может образоваться до 300 г кетоновых тел. Основной же источник кетообразования в организме - масляная кислота. Удаление ее из организма прекращает кетонемиию. Местом образования кетоновых тел считают ткани рубца, печени, а иногда молочную железу. Утилизируются кетоновые тела почти всеми тканями организма.

Главное условие для окончательного распада кетоновых тел до углекислого газа и воды в организме - присутствие достаточного количества глюкозы в тканях и крови. Максимальная утилизация кетоновых тел тканями организма возможна при концентрации их в крови на уровне 20 мг %, превышение этого предела ведет к кетонемии. Выведение кетоновых тел из организма с мочой, молоком и выдыхаемым воздухом сопровождается выделением равного количества ионов натрия и калия, что является причиной снижения щелочного резерва крови.

Для профилактики кетонемии у жвачных животных обычно рекомендуют гормональные препараты типа инсулина, АКТГ, тироксина, а также глицерин, глюкозу, пропионовую кислоту и ее соли. Введение их в организм считается необходимым для увеличения в рубце пропио-

новой кислоты и уменьшения масляной. Этому способствуют также балансирование рационов по протеину и углеводам, скармливание животным крахмалистых и сахаристых кормов.

Скармливание коровам силоса с пропионовокислой закваской активизирует деятельность целлюлозолитических бактерий в пищеварительном тракте, в результате чего усиливаются разложение клетчатки, стимулируется развитие пропионовокислых бактерий в рубце, лучше усваиваются питательные вещества рациона. Так, коэффициент переваримости основных компонентов рациона с таким силосом выше, чем рациона с силосом спонтанного брожения: по сырому протеину - на 4%, сырому жиру - на 8,4%, сырой клетчатке - на 2,1% и безазотистым экстрактивным веществам - на 3%. Силос с закваской у лактирующих коров вызывает увеличение концентрации сахара на 10-15%, резервной щелочности - на 20-40 мг%, снижает концентрацию кетоновых тел на 5-7 мг% и тем самым профилактирует ацидоз. У стельных сухостойных коров активизируется пищеварение, улучшается физиологическое состояние. Об этом свидетельствуют увеличение в крови щелочного резерва в среднем на 10 мг%, концентрации сахара - на 20 мг%, снижение в ней уровня кетоновых тел на 4,6 мг% и рождение здоровых, жизнеспособных телят. У лактирующих коров повышается жирность молока на 0,20-0,25%, содержание белка - на 0,20-0,30% и лактозы - на 0,10-0,20%.

Использование углеаммонийных солей (УАС) в количестве 10 кг/т корма дает положительные результаты при раскислении кукурузного силоса. Кроме того, силос одновременно обогащается протеином.

3. Аэробное разложение кукурузного силоса

Силос хорошего и самого высокого качества иногда подвергается быстрому нагреванию при выемке из хранилища или при доступе воздуха хранилище.

В кукурузном силосе аэробные потери, в некоторых случаях, достигали 32% в течение 15 дней. [7]

В силосах, в которых происходит аэробная порча, зона повышенной температуры распространялась сначала на поверхность силоса в хранилище (бурте), а со временем углублялась на 20-40 см. В дальнейшем поверхностный слой (0-15 см) охлаждался, рН в нем повышался до 8,5-10,0 и начиналось развитие плесневых грибов. Таким образом, на первой стадии порчи происходит разогревание и увеличение рН, а на второй стадии порчи - плесневение. Результатом этих негативных явлений является разрушение молочной кислоты, углеводов и других ценных веществ с образованием опасных для здоровья животных микотоксинов.

3.1. Причины аэробного разложения корма.

Под “вторичным” брожением подразумевают окисление органических кислот (главным образом молочной кислоты), образовавшихся в процессе силосования, при доступе воздуха уже после законченного брожения. Этот термин, часто употребляющийся в последние несколько лет, не совсем точен в научном смысле. Если брожение - это процесс анаэробного расщепления углеводов, то “вторичное” брожение - противоположный процесс ферментативного разложения при доступе кислорода.

Проникновение воздуха приводит к быстрому распаду углеводов, молочной кислоты и в дальнейшем распаду белка с повышением pH. На практике это сопровождается термическим процессом, неприятным запахом, нарушением структуры корма (мажущаяся, разрушенная). Даже при слабом самосогревании до 40° С животные отказываются от такого корма.

Медленное заполнение, задержка герметизации – все это процедуры, способствующие увеличению популяции аэробных микроорганизмов, которые начнут активно развиваться, как только будет вскрыто силосохранилище.

3.2. Микрофлора аэробного разложения корма

Установлено, что первичными возбудителями вторичной ферментации являются дрожжи, которые обладают способностью к ассимиляции (расщеплению) молочной кислоты.

Впервые присутствие дрожжей в силосе установлено в 1932 г., но их значение недооценивалось до 1964 г., когда выяснилось что дрожжи играют главную роль в разложении силоса при доступе к нему воздуха [3]. Отсутствие интереса к этим микроорганизмам объяснялось тем, что их количество в силосе незначительно. Однако силос из кукурузы нередко характеризуется высокой численностью этих микроорганизмов и особенно когда аэробная фаза в силосохранилище была продолжительной.

Основные дрожжи, встречающиеся в силосе, разделены на две группы:

1. Дрожжи “низового” брожения, или осадочные, которые предпочтительно сбраживают сахара (*Torulopsis* sp.)
2. Дрожжи “верхового” брожения, или пленчатые, имеют слабую способность к сбраживанию, но эффективно используют молочную кислоту в качестве субстрата (*Candida* sp, *Hansula* sp.).

Изучение динамики брожения показало, что содержание дрожжей в самосогревающемся кукурузном силосе первоначально составляло $10^5 - 10^7$ дрожжей в 1 г сразу после выемки, а затем постепенно снижалось. Большинство выделенных штаммов дрожжей из таких силосов относятся к *Candida* sp, *Hansnula* sp. Такие наиболее распространенные возбудители нестабильности как *Candida krusei*, *Candida lamlica*, *Pichia strasburgensia*, *Hansenula anomala* устойчивы к очень низкому рН.

После 5-дневного аэробного хранения нестабильный кукурузный силос имеет астрономически высокое число не только дрожжей, но и других микроорганизмов (таблица 2).

Таблица 2
Количество микроорганизмов в нестабильном кукурузном силосе 5-дневного аэробного хранения, микр. кл./г силоса

Обработка	рН	Дрожжи	Стрептомицеты	Бактерии
необработанный	6,92	$5,1 \times 10^8$	2×10^9	$5,8 \times 10^9$
0,2% пропионовой К-ты	6,98	$2,0 \times 10^8$	2×10^9	$4,3 \times 10^9$
0,4% "-"	6,90	$1,7 \times 10^8$	2×10^8	$2,0 \times 10^9$
0,8% "-"	7,20	$3,3 \times 10^7$	1×10^8	$1,0 \times 10^9$
1,6% "-"	4,19	$9,2 \times 10^9$	5×10^6	$2,1 \times 10^6$
2,0% "-"	4,09	$< 10^2$	5×10^5	$3,0 \times 10^6$

Особенно поразительно присутствие в силосе обитателей нейтральных или слабощелочных почв - стрептомицетов. Их наличие, как и "истинных" силосных плесеней, является одной из причин непригодности для скармливания такого силоса. Но как при наличии "истинных" плесневых грибов, так и чуждых для силоса стрептомицетов речь идет не о первичных возбудителях вторичной ферментации, а уже о вторичной флоре при аэробной нестабильности. [8]

В конце спонтанного брожения силосной массы из кукурузы количество дрожжей составляет не менее 10^4 клеток в 1г корма (таблица 3).

Кукурузный силос (конечная оценка после 173 дней)

Вариант	pH	Мас- ляная к- та, %	Молоч- ная к-та , %	Бродильн. газ потери г/вес	Дрожжи	Сохран- ность CO ₂ мг	Катала- за	Стабиль- ность
Необрабо- танный	3,80	0	2,65	4,0	10 ⁴	< 100	+++	-
+0,2% про- пионовая кислота	3,75	0	2,45	3,7	10 ²	5,3	+	+
+0,3% про- пионовая кислота	3,75	0	2,17	2,0	< 10 ²	41,5	-	+

Плесневые грибы, как и дрожжи, играют негативную роль в разложении силосов при доступе к ним воздуха, так как образуют токсичные вещества – микотоксины. В изученных образцах, отобранных из силосохранилищ перед началом кормления, были выделены и определены плесени *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. и др. У животных, получавших заплесневевший кукурузный силос, содержащий *A. fumigatus*, наблюдались воспаления тонких кишок, изменения в промежуточных тканях легких, потеря аппетита, диарея [3].

Нарушение сердечной деятельности (пульс учащен, аритмичный) и дыхания, расстройство пищеварения (атония рубца или усиленная перистальтика кишечника), угнетение, отказ от корма вызваны микотоксинами *Fusarium sporotrichiella*, *Geotrichum candidum*. Такой силос придает силосу прогорклый запах и вызывает микозы у животных [3].

3.3. Способы повышения аэробной стабильности кукурузного силоса.

Правильное вскрытие силосного хранилища, микробиологический анализ закладываемой зеленой массы в силосохранилище, применение химических консервантов, обладающих фунгицидными (фунгистатическими) свойствами – основные меры для ограничения микробиологической порчи при длительном скармливании или аэробном хранении кукурузного силоса.

Наиболее очевидный и эффективный способ предотвращения аэробного разложения – это скармливание силоса животным в день извлечения из силосохранилища. Частое изъятие корма также усиливает разложение на вскрытой поверхности силосохранилища. Выгруз-

ка должна производиться без перемещения слоев, нарушения монолитности силоса, оставшегося в силосохранилище.

Одной из возможных мер улучшения аэробной стабильности кукурузного силоса является обработка зеленой массы химическими веществами, подавляющими аэробную микрофлору корма.

В таблице 4 представлены наиболее часто используемые консервирующие препараты, которые оказывают фунгистатическое (фунгицидное) действие на возбудителей вторичного брожения [6].

Формиат кальция и уксусная кислота практически не оказывают тормозящего действия на дрожжи, если применяемая концентрация ниже 0,5%. Несмотря на быстрый распад нитрита натрия, гексаметилентетрамина их рекомендуют для ограничения процессов вторичного брожения, так как они «освобождают» силос от дрожжей к началу брожения. Самыми эффективными в качестве консервантов фунгистатического (фунгицидного) действия на вторичные процессы брожения являются пропионовая, уксусная кислоты, бензоат натрия, поскольку они при выемке силоса из хранилища сохраняются в значительной степени.

Сравнительное изучение фунгистатических (фунгицидных) свойств пропионовой, муравьиной, бензойной кислот, бензоата натрия, нитрита натрия, консерванта-обогапителя (в состав которого входит пропионовая кислота и мочевины), финских консервантов (типа Viher) показало, что наибольшей активностью обладали нитрит натрия и бензойная кислота, которые ингибировали рост дрожжей до 98%. Сила воздействия химических консервантов зависела от их дозы, концентрации водородных ионов и количества дрожжевых клеток.

Таблица 4

Действие химических веществ на дрожжи.

Консервирующие вещества	Фунгистатическое действие	Фунгицидное действие	Ингибирующая (консервирующая) доза - дрожжей, %	Ингибирующее действие, кислотность		Распад консервантов 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	+	+	+++
Формиат кальция	+	-	>0,5	+	+	0(+)
Гексаметилен тетрамин	+	+	0,025	+	+	+++

Использование препаратов, созданных на основе комбинированных гомоферментативных и гетероферментативных штаммов молочнокислых бактерий, также способствует повышению сохранности силоса в процессе выемки из силосохранилища [1]. Хотя включение гетероферментативных бактерий приводит к некоторому увеличению

потерь питательных веществ в процессе силосования, оно способствует увеличению в корме уксусной кислоты и, следовательно, повышению его аэробной стабильности [5].

Таким образом, применяемые в производственных условиях технологии заготовки кукурузного силоса не всегда обеспечивают получение высокопитательного корма. Силос бывает нередко переокисленным и поедаемость его животными невысока. Отсюда низкая эффективность использования энергоресурсов. Обильное кормление животных переокисленным силосом приводит к нарушению уровня сахара, щелочного резерва в крови, к развитию кетозов и т.д.

В практике известны случаи, когда кукурузный силос хорошего качества быстро "согревается" и очень быстро плесневеет при выемке его из хранилища или в самом хранилище при доступе воздуха. Причиной аэробной нестабильности является наличие дрожжей (*Candida* sp. *Hansenula* sp), которые могут ассимилировать (использовать, разрушать) молочную кислоту. Расщепление последней приводит к тому, что кислая среда сменяется на щелочную (рН 8,5-10,0), создаются благоприятные условия для развития плесневой, маслянокислой, гнилостной микрофлоры.

В том случае, когда в 1 г исходной силосуемой массы содержится более $4 \cdot 10^5$ грибов, нельзя получить из нее аэробно стабильный силос и необходимы дополнительные меры для ограничения потерь.

Для подавления возбудителей аэробного разложения существуют препараты с фунгицидной (фунгистатической) активностью. Наилучшую активность против дрожжей показала бензойная кислота, нитрит натрия, которые почти полностью (98%) ингибировали дрожжи.

Для улучшения аэробной стабильности кукурузного силоса предлагаются комплексные биопрепараты на основе гомо- и гетероферментативных молочнокислых бактерий.

4. Методы изучения возбудителей аэробного разложения силоса.

Занятие 1

Тема занятия: Изучение физиолого-биохимических особенностей дрожжей-возбудителей вторичного брожения силоса

Цель занятия: Получить накопительную культуру, выделить чистую культуру, определить чистоту выделенной культуры.

Время: 8 часов

Оборудование и материалы: 1) 3 колбы, 13 пробирок, сахарометр, сусло, агар-агар, водопроводная вода.

2) 9 стерильных чашек Петри, 3 пробирки с водопроводной стерильной водой, петли, шпатели, 300 мл сусло-агара (СА) в колбе.

3) предметные и покровные стекла, 4 пробирки со скошенным СА (предварительно расплавить СА в пробирках), чашки Петри, шпатели, 3 пипетки (1-2мл),

4) микроскоп, 18 чашек Петри с МПА, красители, предметные, покровные стекла.

Методические указания:

Занятие 1.1. Для приготовления сусло-агара (СА) профильтровать солодовое сусло через вату, развести водопроводной водой до концентрации 8°Б (по Баллингу), пользуясь сахарометром, установить рН 6,0 и разлить сусло в 3 колбы. В 2 колбы налить по 300 мл в каждую, добавить 2% агара и, не расплавляя, отдать на стерилизацию при 0,5 атм. В 3-ю колбу налить 100 мл сусла, добавить 2% агара, расплавить на водяной бане, разлить в 10 пробирок (СА наливать на 1/3 пробирки) и отдать на стерилизацию при 0,5 атм. Разлить водопроводную воду в 3 пробирки по 3-5 мл в каждую и отдать их на стерилизацию при 1 атм.

Подготовить к стерилизации 9 чашек Петри и 3 шпателя.

Занятие 1.2 Для получения изолированных колоний дрожжей небольшое количество исходного материала внести в пробирку со стерильной водопроводной водой и тщательно перемешать. Приготовить 3 суспензии, используя различный исходный материал (кукурузный силос, виноград, прокисшее варенье). Для посева использовать петлю суспензии. Каждую суспензию высевать в 3 чашки Петри с СА. Рассев провести шпателем (по методу Дригальского).

Засеянные 9 чашек Петри поместить в термостат при 30°C на 2-5 сутки.

Для проверки чистоты выделенной культуры приготовить: 250 мл МПА в колбе (к 250 мл МПБ добавить 2% агара); водопроводную воду в 3 пробирках с 8-10мл в каждой. МПА и воду отдать на стерилизацию при 1 атм.

Подготовить к стерилизации 18 чашек Петри, 6 шпателей и 3 пипетки на 1-2 мл.

Занятие 1.3 Из 10 приготовленных пробирок СА на занятии 1.1 расплавить СА в 4 пробирках и приготовить скошенный СА. Остальные 6 пробирок с СА оставить стерильными для дальнейшей работы. Просмотреть колонии на чашках Петри, используя посе́вы предыдущего занятия 1.2. Выбрать 3-5 изолированных колоний, описать их и из каждой приготовить мазки, окрасить простым методом – 1% водным раствором метиленовой сини в течение 3-5 мин. Мазки просмотреть под микроскопом. Сделать отсев из 3 дрожжевых колоний в пробирки со скошенным СА. Для каждой колонии использовать 1 пробирку. Засеянные пробирки поставить в термостат на 30°.

Занятие 1.4 Расплавить СА в пробирках и приготовить скошенный агар. Проверить чистоту 2-3 выделенных культур дрожжей визуально, микроскопированием (приготовить фиксированные окрашенные препараты) и рассевом на чашки Петри с МПА и СА. Для посева расплавить МПА и СА и разлить их в стерильные чашки Петри. Сделать суспензию дрожжей в стерильной водопроводной воде. Для посева берут петлю суспензии. Рассев провести шпателем, используя для каждой суспензии три чашки с МПА и три чашки с СА (по Дригальскому). Перед приготовлением суспензии культуры дрожжей необходимо пересеять в пробирки со скошенным СА, используя для каждой культуры 1 пробирку. Засеянные чашки и пробирки поместить в термостат при 30°C.

Основные вопросы темы (объяснение преподавателя)

Преподаватель объясняет, что умение выделить микроорганизмы одного вида из смешанной популяции, существующей в природе, и поддерживать чистоту культуры – необходимое условие работы с микроорганизмами. Подчеркивает, что выделение возбудителей нежелательных процессов при созревании силоса, сенажа и др. видов кормов с целью изу-

чения методов ограничения их развития представляет практическое значение. Объясняет, что выделение чистой культуры обычно включает три этапа: 1 – получение накопительной культуры; 2 – выделение чистой культуры; 3 – определение чистоты выделенной культуры. Сущность метода получения накопительной культуры заключается в создании селективных, т.е. избирательных условий, которые обеспечивают преимущественное развитие изучаемой группы из смешанной популяции (использование сусло-агара (СА) для культивирования дрожжей). После того как получена накопительная культура, приступают к выделению чистой культуры, которая может быть получена из определенной колонии (или из 1 клетки). Определение чистоты культуры микроорганизмов осуществляется визуально, микроскопическим контролем и посевом на МПА.

Самостоятельная работа студентов.

Занятие 1.1. Для выделения дрожжей из исходного материала и дальнейшей работы с выделенной культурой приготовить сусло-агар (СА) в колбах, пробирках; пробирки с водопроводной водой; чашки Петри и пипетки (на 1-2мл) подготовить к стерилизации.

Занятие 1.2. Для получения изолированных колоний сделать рассев исходного материала на чашки Петри с СА, предварительно сделав разведение в стерильной водопроводной воде.

Занятие 1.3. Приготовить скошенный СА, предварительно расплавив его в пробирках. Приготовить препараты из 2-3 колоний, отобранных с чашек Петри и окрасить мазки. Описать, зарисовать колонии, используя посевы занятия 1.2. Для посева на скошенной СА делают посев клеток дрожжей, одинаковых по морфологии.

Занятие 1.4. Проверить чистоту 2-3 культур визуально, микроскопированием (приготовить фиксированные окрашенные препараты) и рассевом на чашки Петри с МПА. Культуры перед приготовлением суспензии пересевать в пробирки со скошенным СА для дальнейшей работы. Изучить морфологические особенности клеток выделенной культуры.

Контрольные вопросы:

1. Методы выделения чистой культуры?
2. Какие микроорганизмы объединяют в группу дрожжей?
3. Морфологические особенности дрожжевых клеток?
4. Какими способами размножаются дрожжи?
5. Какова внутренняя структурная организация дрожжей?

Задание к следующему занятию.

1. Развитие дрожжей в разных условиях аэрации.
2. Дыхание микроорганизмов.

Литература:

[2] [3] [6]

Занятие 2**Тема занятия:**

Изучение физиолого-биохимических особенностей дрожжей-возбудителей аэробного разложения сулоса

Цель занятия:

Сравнить развитие дрожжей в разных условиях аэрации.

Время:

6 часов

Оборудование и материалы:

3 высокие узкие пробирки, заполненные на 2/3 сулом, 3 конические колбы по 1 см сулоса, 6 пробирок с СА, 2 пробирки со стерильной водопроводной водой; 5 колб с сулом и различными сахарами, 15 пробирок с поплавками, петли, 10 пипеток (1-2мл), качалки, обеспечивающие встряхивание (вращение) колб, пробирок.

Методические указания:

Занятие 2.1. Приготовить среду для выяснения влияния аэрации на рост дрожжей. Для этого в 3 одинаковые высокие узкие пробирки и 3 одинаковые конические колбы налить один и тот же объем сулоса (8°Б). Слой сулоса в колбах должен быть не более 1 см, что обеспечит свободный доступ кислорода, тогда как слой жидкости в пробирках должен быть как можно выше, чтобы затруднить доступ кислорода. Колбы и высокие пробирки с сулом простерилизовать при 0,5 атм. В течение 30 мин.

Занятие 2.2. Приготовить суспензию дрожжей в стерильной водопроводной воде. Засеять СА в 2 колбах и 2 высоких пробирках одинаковым количеством (2-3 капли) суспензии. Также делают посев в 3 пробирки с жидкой питательной средой 6-8°Б сулом. Микробную суспензию высевают в пробирку с расплавленной и остуженной до 40-45° СА. Мик-

робную суспензию засевают уколом в агаризованную питательную среду в пробирки и ставят в термостат при 30°C. Через 2-3 суток вынуть из термостата и поставить в холодильник до следующего занятия.

Занятие 2.3. Учет типа дыхания микроорганизмов. Проводят просмотр засеянных колб и пробирок, высеянных на занятии 2.2.

Основные вопросы темы (объяснения преподавателя)

По отношению к кислороду микроорганизмы делятся на облигатные анаэробы, факультативные анаэробы, облигатные аэробы. Чтобы судить о принадлежности микроорганизма к той или иной группе, суспензию микроорганизмов высевают в пробирки с расплавленной и остуженной до 40-45° агаризованной средой. Строгие аэробы растут на поверхности среды в верхнем слое. Факультативные анаэробы обычно развиваются по всей толще среды. Строгие анаэробы растут только в глубине среды, у самого дна пробирки. В жидких средах аэробные микроорганизмы, в т.ч. дрожжи, растут, образуя на поверхности пленку. Факультативные анаэробы растут в толще жидкой среды и на поверхности, вызывая более или менее равномерное ее помутнение.

Самостоятельная работа студентов.

Занятие 2.1. Приготавливают питательные среды для выяснения влияния аэрации на рост дрожжей.

Занятие 2.2. Просматривают чашки Петри, засеянные на предыдущем занятии, выбирают изолированные колонии.

Проводят посев микробной суспензии в плотную среду (CA) методом укола, в расплавленную и остуженную агаризованную среду, а также в жидкую среду.

Ставят в термостат при 30°C на 2-3 суток для следующего занятия.

Занятие 2.3. Сравнивают развитие дрожжей в разных условиях аэрации.

Делают рисунки и выводы, отражающие рост дрожжей:

- а) при посеве уколом в плотную среду;
- б) при посеве в расплавленную агаризованную среду;
- в) в жидкой среде.

Контрольные вопросы:

1. К какой группе микроорганизмов принадлежат дрожжи по отношению к кислороду?
2. Какова роль дрожжей в аэробной нестабильности консервированных растительных кормов?
3. Какие существуют способы определения принадлежности микроорганизмов к той или иной группе по отношению к кислороду?

Задания к следующему занятию.

1. Использование дрожжами соединений углерода.

Литература:

[2] [3] [6]

Занятие 3

Тема занятия:	Изучение физиолого-биохимических особенностей дрожжей-возбудителей вторичного брожения silosa
Цель занятий:	Изучить способность дрожжей использовать соединения углерода (сахара, органические кислоты).
Время	4 часа
Оборудование и материалы:	4 пробирки со стерильной водопроводной водой, 15 пробирок с жидкой средой и поплавками, 15 пробирок с плотной средой, 10 пипеток, сахара (глюкоза, лактоза, сахароза, мальтоза).
Методические указания	Занятие 3.1. Для выяснения способности выделенной культуры дрожжей развиваться на средах с различными сахарами приготовить 300 мл среды следующего состава (г/100 мл): пептон-0,20; KH_2PO_4 -0,25; вода водопроводная. Разлить среду в 5 колб по 60 мл в каждую. В 1-ю колбу добавить глюкозу, во 2-ю - лактозу, в 3-ю - мальтозу, в 4-ю - сахарозу. Сахара добавлять в концентрации 2%. Среда в пятой колбе - контрольная, т.е. не содержащая источника углерода. Все приготовленные среды разлить по 10 мл в 15 пробирок (по 3 пробирки на каждый вариант), используя градуированные пипетки. Предварительно в каждую пробирку внести поплавок запаянным концом вверх. Поплавок должен быть целиком заполнен средой. Пробирки со средами отдать на стерилизацию при 0,5 атм. Разлить водопроводную воду в 2 пробирки по 3-5 мл в каждую и отдать на стерилизацию при 1 атм.

Подготовить к стерилизации 4-6 пипеток на 1-2 мл. Для определения способности дрожжей расти на средах с органическими кислотами приготовить среду следующую состава (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,2; NaCl -0,1; агар – 15,0; органические кислоты в виде соли Na или K – 2,0, pH 6,8. До стерилизации к среде добавляют 20 мл 0,04%-ного раствора индикатора фенолрот, который в интервале pH 6,8-8,4 изменяет окраску от желтой к красной. Среду разлить в пробирки и простерилизовать при 1 атм. в течение 20 мин.

Занятие 3.2. Приготовить суспензию дрожжей в стерильной водопроводной воде, засеять среды с различными сахарами путем внесения в каждую пробирку по 1 капле посевного материала. Поставить в термостат при 30° на 2-5 суток. Использование сахаров определяют по изменению цвета индикатора бромкрезолпурпур, изменяющий цвет от пурпурного к желтому в интервале pH 6,8-5,2.

Для определения способности дрожжей расти на средах с органическими кислотами проводят посев методом укола; продолжить культивирование от 2 до 5 суток. О потреблении органических кислот свидетельствует рост по уколу и изменение кислотности среды в щелочную сторону, что отчетливо заметно по индикатору фенолрота, который в интервале pH 6,8-8,4 изменяет окраску от желтой к красной.

Для выявления гликогена в клетках дрожжей среду, в которой их выращивали, подкисляют и окрашивают затем раствором Люголя. Гранулы гликогена при этом должны окрашиваться в красновато-коричневый цвет.

Для определения волютина готовят тонкий мазок клеток, высушивают его на воздухе и фиксируют в пламени горелки. На фиксированный мазок наливают метиленовый синий по Леффлеру и окрашивают клетки в течение 10 мин. Краситель сливают, препарат промывают водой, высушивают и микроскопируют с иммерсионной системой. При этом клетки окрашиваются в голубой цвет, а зерна волютина – в фиолетово-красный.

Основные вопросы темы (объяснения преподавателя)

Преподаватель объясняет, что дрожжи способны использовать простые сахара для конструктивного и энергетического метаболизма с расщеплением их до спирта.

Преподаватель особо подчеркивает, что многие дрожжи могут использовать в качестве единственного источника углерода органические кислоты, в т.ч. молочную.

Дрожжи при избытке сахара часто накапливают запасные вещества – гликоген, волютин и др. Гликоген имеет вид зерен, глыбок или крупных конгломератов в цитоплазме. Скопление зерен гликогена могут придавать клеткам дрожжей гранулярную структуру. В вакуолях часто обнаруживаются полифосфатные гранулы.

Самостоятельная работа для студентов.

Определяют рост или его отсутствие на среде с изучаемым источником углерода (по помутнению среды, образованию пленки или осадка).

Фиксируют изменение цвета индикатора, которое указывает на образование кислых продуктов метаболизма. Результаты наблюдений сравнивают с показателями роста в контрольной среде, не содержащей испытываемого сахара. Зарисовывают в рабочих тетрадях рисунки, демонстрирующие образование кислых (К) и накопление газов (Г) в поплавке:

- 1) рост культуры сопровождается образованием газа;
- 2) газ не образуется.

Подготовить отчет по результатам проделанной лабораторно-практической работы.

Контрольные вопросы:

1. Какие образуются основные продукты брожения в результате использования дрожжами сахаров?
2. Какие конечные продукты брожения образуются в результате использования дрожжами молочной кислоты?
3. Почему дрожжи относят к нежелательной микрофлоре при силосовании растительных кормов?

Литература:

[2] [3] [6]

ЛИТЕРАТУРА

1. Абраскова С.В., Буряко И.А., Астапович Н.И. Сравнительная эффективность использования биопрепарата Лаксил и химических консервантов // Мат. междунар. конф. - 2000. - С.142-143.
2. Асонов Н.Р. Микробиология: Учебник для студентов высших учебных заведений. - 4-е изд., перераб. и доп. - М.: Колос, 2001. - 352 с.
3. Мак-Дональд П. Биохимия силоса. - М.: Агропромиздат, 1985. - 270 с.
4. Нугматжанов К.Г. Микробиологические способы повышения качества корма. - Алма-Ата, 1987. - 120 с.
5. Победнов Ю.А. Влияние бактериальных препаратов на аэробную стабильность силоса. - Кормопроизводство. - 1997. - №11. - С.24-26.
6. Шлягел Г. Общая микробиология. - М.: Мир, 1972. - С.241-246
7. Beck Th. Beeinflussung der Nachgarung durch Seliernmittel Wirtschaftseig Futter - 1975. - B.21, H.1. - S.55-56
8. Victor D, Ress H. The aerobic deterioration of grass silage on effect on the water - soluble carbohydrate and the associated heat production // of. Sci. Food. Agric. - 1982. - H33. - P.499-508

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	3
1 Микрофлора зеленой массы и силосованной кукурузы....	4
1.1. Микрофлора зеленой массы кукурузы.....	4
1.2. Микрофлора силосованной кукурузы.....	5
1.3. Микрофлора кукурузы, пораженной заморозками.....	6
2. Влияние кукурузного силоса на обмен веществ в организме животных.....	7
3. Аэробное разложение корма.....	9
3.1. Причины аэробного разложения корма.....	10
3.2. Микрофлора аэробного разложения корма.....	10
3.3. Способы повышения аэробной стабильности кукурузного силоса.....	12
4. Методы изучения возбудителей вторичной ферментации.....	15
Литература.....	23

Подписано в печать 28.10.2003 г.

Заказ № 303 Тираж 100 экземпляров. Объем 2,5 п.л.

Лицензия ЛП № 362 от 11.08.99 г.

Отпечатано в ротаторном участке УО "Витебская ордена
"Знак Почета" государственной академии ветеринарной
медицины"

Адрес: 210602, г. Витебск, ул. Доватора, 7/11