МІКРОБІОЛОГІЧНА ОЦІНКА ПЛЮЩЕНОГО ВОЛОГОГО ЗЕРНА КУКУРУДЗИ, ФЕРМЕНТОВАНОГО ШТАМАМИ ПРОБІОТИЧНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ

Н. О. Кравченко, М. Г. Передерій, О. М. Дмитрук

Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН,
вул. Шевченка, 97; м. Чернігів, 14035, Україна; e-mail: nat.probiotik@gmail.com

Мета. Дослідити вплив *Bacillus subtilis* та пробіотичних штамів молочнокислих бактерій на мікробіологічні процеси за ферментації плющеного вологого зерна кукурудзи. **Методи.** Мікробіологічні, зоотехнічні. **Результати.** Досліджено антифунгальну активність пробіотичних штамів *Bacillus subtilis* BPT-B1 та *Lactobacillus plantarum* KT-L18/1 до мікроміцетів, ізольованих з вологого плющеного зерна кукурудзи. Встановлено, що *B. subtilis* BPT-B1 активно пригнічує ріст плісневих грибів родів *Mucor*, *Rhizopus* і *Penicillium* та дріжджів родів *Sacharomyces* та *Torulopsis*. *L. plantarum* KT-L18/1 виявляє слабку антифунгальну активність, виражений антагонізм спостерігається лише щодо мікроміцетів роду *Penicillium* та дріжджів роду *Torulopsis*. За впливу *B. subtilis* BPT-B1 та *L. plantarum* KT-L18/1 на 70-у добу ферментації відзначено збільшення на три порядки чисельності молочнокислих бактерій проти цього ж показника у вихідній сировині; водночас не виявлено маслянокислих бактерій, плісневих грибів та патогенних мікроорганізмів. За доступу повітря до приготовленого корнажу упродовж 14 діб спостерігається розвиток мікроміцетів у всіх варіантах, за винятком інокуляції сировини штамом *L. plantarum* KT-L18/1. Водночас в корнажі без внесення консервантів відзначено збільшену у 2,4 раза чисельність мікроміцетів, що підвищує вірогідність прискореного аеробного псування корму та загрозу контамінації мікотоксинами. Кислотність корму як на 70-у добу консервування, так і на 14-у добу від початку доступу повітря у варіантах з внесенням пробіотичних штамів *B. subtilis* BPT-B1 і *L. plantarum* KT-L18/1 та біоконсерванту Sil-All 4×4 була стабільно оптимальною у межах рН 4,0–4,3. У консервованому плющеному вологому зерні кукурудзи без внесення консерванту рН корму підвищилася з 4,6 до 5,2, що є сприятливим для активного розвитку аеробної мікрофлори. **Висновки.** Заготівля плющеного зерна кукурудзи, обробленого штамми *B. subtilis* BPT-B1 та *L. plantarum* KT-L18/1, забезпечує встановлення оптимального рівня кислотності корму, запобігає інтенсивному розвитку гнильних мікроорганізмів, мікроміцетів, що сприяє кращій аеробній стабільності корму упродовж 14 діб після доступу повітря проти корму без використання пробіотичних мікроорганізмів, насичує корнаж корисною для організму тварин пробіотичною мікрофлорою.

Ключові слова: плющене зерно кукурудзи, консервування, біологічні консерванти, пробіотичні бактерії, молочнокислі бактерії, мікроміцети.

Вступ. До сільськогосподарських культур, які мають високі кормові якості, належить кукурудза. Для годівлі тварин використовують зелену масу, початки та зерно кукурудзи. Одним із недорогих та перевірених часом способів збереження урожаю, зокрема

кукурудзи, з максимально близьким до вихідної рослинної сировини вмістом поживних речовин та енергії, є його консервування.

В Україні набуває поширення порівняно нова, перспективна технологія консервування плющеного зерна кукурудзи на ранніх

стадіях стиглості, за якої процес плющення дозволяє покращити смакові якості зерна та підвищити поживну цінність вуглеводного та протеїнового комплексів [1–3].

Проте складність збереження зернової сировини полягає в тому, що отримати її вільною від мікроорганізмів неможливо, і вже за вологості більше 10–15 % відбувається розвиток гнилісних бактерій та мікроміцетів, водночас значно погіршується поживна цінність корму [4].

Новітні ресурсозберігаючі технології заготівлі кормів передбачають використання високоефективних консервантів. Найбільш економічними та екологічно безпечними є біологічні консерванти, механізм дії яких полягає в стимуляції ферментації та швидкого зниження активної кислотності корму з метою пригнічення розвитку небажаної мікрофлори. До складу біологічних консервантів входять одна або декілька культур мікроорганізмів, які у збагаченому поживними речовинами середовищі, розмножуючись, продукують біологічно активні речовини (БАР), за рахунок яких створюється ефект консервування сировини [5–7]. Утім, не кожна культура бактерій синтезує потрібні БАР у необхідних кількостях, тому для спрямування мікробіологічних процесів за ферментації зернової маси в бажаному напрямку доцільно проводити постійний пошук нових, метаболічно активних штамів бактерій.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Поширенню технології консервування плющеного зерна кукурудзи на ранніх стадіях стиглості в Україні, Білорусі та Росії сприяв світовий досвід, насамперед Фінляндії та Швеції. В процесі заготівлі плющеної кукурудзи використовується зерно вологістю в межах 25–40 %. За таких умов зерно потребує герметичного збереження. Для плющення використовуються спеціальні вальцюві млини, які дозволяють плющити зерно, рівномірно розподіляти консервант, запаковувати готову масу у герметичну вакуумупаковку (поліетиленові рукави) [8].

Недостатні ущільнення та герметизація у момент закладання для ферментації плющеного зерна кукурудзи на ранніх стадіях стиглості сприяють контакту з повітрям та спричиняють погіршення якості корму. Доступ повітря стимулює розмноження насамперед

дріжджів, які руйнують молочну кислоту, рослинний цукор тощо, спричиняючи виділення тепла та самозігрівання корму, який стає аеробно нестабільним. За тривалого впливу повітря до руйнування молочної кислоти долучаються і плісеневі гриби, синтезуючи небезпечні мікотоксини. Тільки під час виймання корму для годівлі тварин, за оцінками спеціалістів, від аеробного псування щорічно втрачається близько 10 % сухої речовини [9]. Тому одним з ключових моментів технології консервування зерна кукурудзи є застосування біологічних консервантів, здатних знизити цей показник.

Класичними мікроорганізмами, які використовуються як основа біоконсервантів, є молочнокислі бактерії. Консерванти на основі гомоферментативних молочнокислих бактерій покращують активну кислотність та ферментацію корму шляхом продукування великої кількості органічних кислот (у селекціонованих гомоферментативних штамів молочнокислих бактерій ефективність зброджування рослинних цукрів до молочної кислоти може сягати 99 %, тоді як у природних штамів не перевищує 60–70 %), за рахунок чого регулюються процеси пригнічення розвитку гнильних та маслянокислих бактерій [10; 11]. Окремими дослідженнями показано, що використання лише гомоферментативних бактерій покращує якість ферментації (хоча кормаж у такому разі піддається аеробному псуванню під час виймання та згодовування), тоді як гетероферментативні бактерії більшою мірою сприяють аеробній стійкості корму за доступу повітря [12; 13]. Для цього широко застосовують бактерії *Lactobacillus buchneri*, які перешкоджають процесам аеробного гниття у кормі, за рахунок синтезу низки органічних кислот, зокрема оцтової, що пригнічує ріст мікроміцетів, проте силос із підвищеним вмістом оцтової кислоти має невисокі смакові якості [10].

Представники бактерій виду *B. subtilis*, синтезуючи низку біологічно активних речовин (органічних кислот, ферментів, антибіотиків, зокрема з антифунгальною дією), здатні забезпечувати консервуючий ефект практично у будь-якій рослинній сировині [14–16].

Як свідчать окремі публікації, сьогодні підвищеним попитом користуються багатокомпонентні біоконсерванти, підвищення

ефективності яких досягається за рахунок комбінації видів та штамів бактерій, що дозволяє вирішувати низку завдань одночасно [17; 18].

Мета досліджень: Визначити вплив пробіотичних штамів *B. subtilis* та молочнокислих бактерій на мікробіологічні процеси за ферментації плющеного вологого зерна кукурудзи.

Матеріали та методи досліджень. Об'єкти досліджень. Штами пробіотичних мікроорганізмів *B. subtilis* BPT-B1 та *L. plantarum* KT-L18/1 виділені із шлунково-кишкового тракту молодняка великої рогатої худоби, депоновані у Депозитарії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (м. Київ) та запатентовані [19; 20].

Для отримання маточних культур *B. subtilis* BPT-B1 культивували на стандартних живильних середовищах — м'ясо-пептонному агарі (МПА) та м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) упродовж 24 годин за $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$, бактерії *L. plantarum* KT-L18/1 — на рідкому живильному середовищі де Мана (MRS) [21] упродовж 7 діб у термостаті за $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. Маточні культури *B. subtilis* BPT-B1 культивували на напівсинтетичному поживному середовищі [22] впродовж 24 годин за $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$, а *L. plantarum* KT-L18/1 — на поживному середовищі, що містило 5 % пшеничних висівок, 2 % меляси та 0,5 % крейди [23].

Визначення антифунгальної активності. Як тест-культури використовували мікроміцети родів *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Gliocladium*, *Mucor* та дріжджі родів *Candida*, *Torulopsis*, *Sacharomyces*, виділені з консервованого плющеного зерна кукурудзи співробітниками лабораторії пробіотиків Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН та ідентифіковані доктором біологічних наук Є. П. Копиловим.

Антифунгальну активність *B. subtilis* BPT-B1 досліджували методом відстрочених посівів (перпендикулярних штрихів) [24]. У чашки Петрі з МПА штрихом наносили *B. subtilis* BPT-B1, після інкубації в термостаті за 37°C упродовж 24–48 годин перпендикулярно до нього на відстані уколом вносили тест-культури мікроміцетів. Культури інкубували упродовж 10 діб за температури

28°C . Контрольними варіантами слугували посіви культури мікроміцетів без *B. subtilis* BPT-B1. Ступінь інгібування росту плісневих грибів розраховували за формулою Аббота.

Визначення антифунгальної активності *L. plantarum* KT-L18/1 проводили дифузним методом агарових блоків [25]. Молочнокислі бактерії висівали в чашки Петрі глибинним способом в агаризоване середовище MRS, потім інкубували за температури 37°C впродовж 5 діб. Стерильним пробочним свердлом вирізали агаровий блок з накопиченою культурою молочнокислих бактерій та встановлювали його в іншій чашці Петрі на поверхні агарового середовища, в центр якого уколом вносили міцелій мікроміцетів. Чашки витримували впродовж 12 годин в умовах холодильника для дифузії інгібіторних сполук з блока в товщу агару. Подальше інкубування проводили за температури 28°C впродовж 10 діб. Ступінь антифунгальної активності досліджуваних молочнокислих бактерій визначали за величиною (в мм) зони інгібування росту мікроміцетів навколо агарового блоку.

Постановка досліду з консервування плющеного зерна кукурудзи. У досліді використовували кукурудзу, вирощену на базі МТФ «Красносільська» СТОВ «Надія» (Чернігівська область). Плющення, закладання в поліетиленові рукави та обробку зерна кукурудзи біоконсервантами здійснювали за допомогою установки «Мурска». Для консервування у поліетиленові рукави було закладено 4 варіанти плющеного вологого зерна кукурудзи по 40 т кожен:

варіант 1 — без застосування мікроорганізмів;

варіант 2 — обробка сировини біоконсервантом Sil-All 4×4;

варіант 3 — інокуляція зерна *B. subtilis* BPT-B1;

варіант 4 — інокуляція зерна *L. plantarum* KT-L18/1.

Обробку зерна кукурудзи пробіотичними штамми проводили з розрахунку 1 л на 10 т сировини, а біоконсервантом Sil-All 4×4 — згідно з нормами, рекомендованими виробником (5 г препарату на 1 т сировини).

Період ферментації плющеного вологого зерна кукурудзи тривав 70 діб. Проби плю-

щеного зерна кукурудзи для проведення зоотехнічних та мікробіологічних досліджень відбирали до початку закладання сировини, на 70-у добу консервування та на 14-у добу після відкриття корму [26].

Зоотехнічні дослідження. Визначення активної кислотності (рН) проводили шляхом потенціометричного вимірювання активності водневих іонів на рН-метрі (рН-150 МИ), кількість вільних та зв'язаних органічних кислот визначали за методом Леппера-Фліга [26].

Мікробіологічні дослідження. Середні проби досліджуваного ферментованого зерна кукурудзи ретельно перемішували та готували з них однорідні суспензії за використання стерильної питної води. Чисельність мікроскопічних грибів та дріжджів визначали на середовищі Сабуро шляхом культивування поверхневих посівів суспензій корму впродовж 3–4 діб (за необхідності — 7–8 діб) за температури $(28 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. Чисельність клостридій встановлювали на залізо-сульфітному агарі за кількістю чорних колоній, що вирости у глибині середовища культивування упродовж 24 год. за $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. Чисельність бактерії кишкової групи відмічали за культивування проб корму упродовж доби на середовищі Ендо за температури $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. Чисельність молочнокислих бактерій визначали на середовищі де Мана (MRS) та капутяному агарі з крейдою, підраховуючи кількість колоній через 2–7 діб культивування за $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ [4].

Характеристика вихідної сировини. За мікробіологічними дослідженнями сировини встановлено: чисельність молочнокислих бактерій — $(5,0 \pm 0,3) \times 10^6$ КУО/г, кількість мікроміцетів — $(7,5 \pm 0,3) \times 10^3$ КУО/г, маслянокислих бактерій (клостридій) та патогенних мікроорганізмів не виявлено.

Отримані результати статистично оброб-

лено з використанням пакета прикладних програм Microsoft Office та представлено як середні значення та їх похибки ($M \pm m$) [27].

Результати та їх обговорення. На поверхні плющеного зерна кукурудзи перед початком консервування нами виявлено плісєневі гриби родів *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Gliocladium*, *Mucor* та дріжджі родів *Candida*, *Torulopsis*, *Sacharomyces*.

Встановлено, що *B. subtilis* BPT-B1 активно пригнічує ріст наявних у вологому зерні плісєневих грибів. Найвищий рівень антифунгальної активності штаму-антагоніст виявив до тест-культур мікроміцетів родів *Mucor*, *Rhizopus* та *Penicillium* (табл. 1). У *L. plantarum* KT-L18/1 виявлено слабку антифунгальну активність щодо таких мікроміцетів як *Fusarium*, *Rhizopus*, *Gliocladium*, *Mucor*. Водночас *L. plantarum* KT-L18/1 проявив високу антифунгальну активність щодо мікроміцетів роду *Penicillium*.

Встановлено, що досліджуваний штам *B. subtilis* BPT-B1 пригнічує ріст тест-культур дріжджів (табл. 2). Найчутливішими до цього штаму виявились ізоляти дріжджів родів *Sacharomyces* та *Torulopsis*. Значно нижчу антифунгальну активність до дріжджів родів *Sacharomyces* та *Candida* показав штам *L. plantarum* KT-L18/1. Водночас штам проявив виражений антагонізм до ізолятів дріжджів роду *Torulopsis*, зони затримки росту яких виявились в 1,2 раза більшими проти відповідних показників антифунгальної активності штаму *B. subtilis* BPT-B1.

Отже, досліджуваний штам *B. subtilis* виявив виражений антагонізм до плісєневих грибів та дріжджів, які виділяються з плющеного зерна кукурудзи, що є закономірним, оскільки, за літературними джерелами [28], бактерії цього виду здатні продукувати низку антифунгальних речовин — токсиміцин,

Таблиця 1. Антифунгальна активність пробіотичних штамів бактерій до плісєневих грибів ($n = 3$)

Штами-антагоністи	Ступінь інгібування росту тест-грибів, %				
	<i>Penicillium</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Rhizopus</i>	<i>Gliocladium</i>	<i>Mucor</i>
Зони затримки росту тест-культур плісєневих грибів, мм					
<i>B. subtilis</i> BPT-B1	$93,1 \pm 0,4$	$84,1 \pm 4,8$	$89,0 \pm 4,2$	$90,5 \pm 2,9$	$93,3 \pm 5,0$
<i>L. plantarum</i> KT-18/1	$17,1 \pm 6,9$	$2,0 \pm 0,3$	$2,5 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,2$

Примітка. У табл. 1–4 рівень вірогідності різниці з контролем — $P \leq 0,05$.

Таблиця 2. Антифунгальна активність пробіотичних штамів бактерій до дріжджів ($n = 3$)

Штами-антагоністи	Зони затримки росту тест-культур дріжджів, мм		
	Неспороутворюючі дріжджі		Спороутворюючі дріжджі
	<i>Candida</i>	<i>Torulopsis</i>	<i>Sacharomyces</i>
<i>B. subtilis</i> BPT-B1	13 ± 1	24 ± 1	28 ± 1
<i>L. plantarum</i> KT-L18/1	0	30 ± 3	12 ± 2

мікобацилін, ітурін тощо. Нами виявлено антифунгальну активність *L. plantarum* KT-L18/1, антагонізм якого до мікроміцетів, скоріше за все, пов'язаний із синтезом бактеріоцинів, як-от лактолін, оскільки молочнокислі бактерії виду *L. plantarum* є гомоферментативними та синтезують переважно молочну кислоту, яка не має антифунгальної дії [29].

Отримані результати є підставою для дослідження впливу пробіотичних штамів *B. subtilis* BPT-B1 та *L. plantarum* KT-L18/1 на мікробіологічні процеси при консервуванні плющеного зерна кукурудзи, оскільки за умов низької вологості анаеробне середовище створюється лише через 1–2 дні, що сприяє розвитку мікроміцетів та запуску процесу аеробного псування корму. Як відомо, найбільш схильними до аеробного псування є корми з невисоким забезпеченням цукру та значним вмістом сухої речовини (до такої сировини належить плющене зерно кукурудзи).

За порівняльної оцінки мікробіологічних показників у варіантах плющеного зерна кукурудзи низької вологості, обробленого перед консервуванням пробіотичними бактеріями *B. subtilis* BPT-B1, *L. plantarum* KT-L18/1 та біоконсервантом Sil-All 4×4, встановлено, що на 70-у добу ферментації в зразках усіх

варіантів чисельність молочнокислих бактерій збільшилася на 3 порядки проти цього ж показника у вихідній сировині та на 2 порядки щодо варіанту 1 (без обробки), водночас не виявлено маслянокислих бактерій, мікроміцетів та патогенних мікроорганізмів (табл. 3).

Через 14 діб після відкриття корму та доступу повітря до плющеного зерна кукурудзи кількість молочнокислих бактерій зменшилась у всіх варіантах на 1 порядок. Найменшу їх кількість відзначено у контрольному варіанті: 5×10^6 КУО/г проти $(1,8\text{--}2,5) \times 10^8$ КУО/г у дослідних варіантах. Маслянокислих та патогенних бактерій у жодному із варіантів консервованого плющеного зерна кукурудзи не виявлено. Доступ повітря до консервованого зерна кукурудзи упродовж 14 діб сприяв початку розвитку мікроміцетів у всіх варіантах, окрім дослідного з обробкою зерна *L. plantarum* KT-L18/1. Чисельність грибів у варіанті з *B. subtilis* BPT-B1 становила $3,7 \times 10^2$ КУО/г, тоді як за використання біоконсерванту Sil-All 4×4 показники були на рівні $7,5 \times 10^2$ КУО/г. У контролі відмічено у 2,4 раза збільшену їх кількість, що свідчить про тенденцію до прискорення аеробного псування корму та загрозу контамінації мікотоксинами (табл. 4).

Важливим для оцінки факторів впливу на ефективність процесів бродіння та збере-

Таблиця 3. Вплив пробіотичних штамів бактерій на спрямованість мікробіологічних процесів у консервованому плющеному вологому зерні кукурудзи на 70-у добу консервування

Варіанти	Показники	Молочнокислі бактерії, КУО/г	Мікроміцети, КУО/г	<i>E. coli</i> , КУО/г	<i>Salmonella</i> spp., КУО/г	Клостридії, КУО/г
Без використання мікроорганізмів, контроль		$(4,0 \pm 0,1) \times 10^7$	0	0	0	0
Біоконсервант Sil-All 4×4		$(2,4 \pm 0,2) \times 10^9$	0	0	0	0
<i>B. subtilis</i> BPT-B1		$(2,3 \pm 0,3) \times 10^9$	0	0	0	0
<i>L. plantarum</i> KT-L18/1		$(2,4 \pm 0,2) \times 10^9$	0	0	0	0

Таблиця 4. Вплив пробіотичних штамів бактерій на спрямованість мікробіологічних процесів у консервованому плющеному зерні кукурудзи на 14-у добу після відкриття корму

Показник Варіанти	Молочнокислі бактерії, КУО/г	Мікроміцети, КУО/г	<i>E. coli</i> , КУО/г	<i>Salmo- nella</i> spp., КУО/г	Клост- ридії, КУО/г
Без використання мікроорганізмів, контроль	$(5,0 \pm 0,3) \times 10^6$	$(9,1 \pm 0,2) \times 10^2$	0	0	0
Sil-All 4×4	$(2,5 \pm 0,4) \times 10^8$	$(7,5 \pm 0,3) \times 10^2$	0	0	0
<i>B. subtilis</i> BPT-B1	$(1,8 \pm 0,2) \times 10^8$	$(3,7 \pm 0,2) \times 10^2$	0	0	0
<i>L. plantarum</i> KT-L18/1	$(2,5 \pm 0,3) \times 10^8$	0	0	0	0

ження консервованого плющеного зерна кукурудзи поряд з мікробіологічними показниками є дослідження динаміки зниження рівня кислотності. Зміна балансу розвитку мікроорганізмів, учасників процесу консервування, в бік накопичення молочнокислих бактерій сприяє накопиченню молочної кислоти та частково оцтової — головних чинників зниження рН корму та створення несприятливих умов для гнильних мікроорганізмів.

У наших експериментах встановлено, що на 70-у добу консервування плющеного вологого зерна кукурудзи за впливу біологічних консервантів кислотність корму є оптимальною — у межах рН 4,0–4,3, вміст молочної кислоти є у 4–5 разів більшим, ніж у контрольному варіанті (рис. 1, 2).

На 14-у добу після відкриття корму кислотність у варіанті з обробкою сировини Sil-All 4×4 та дослідних варіантах була стабіль-

ною, на відміну від показників контрольного варіанту, де рН корму за цей час підвищилася з 4,6 до 5,2, що є свідченням активного розвитку аеробної мікрофлори (рис. 2).

Висновки. У ферментованому вологому зерні кукурудзи, заготовленому без застосування консервантів, під час розкриття для згодовування тваринам створюються сприятливі умови для аеробного псування корму. Це пов'язано з тим, що за доступу повітря у кормі швидко зростає чисельність мікроміцетів та інших аеробних мікроорганізмів, що призводить до деградації поживних речовин. Мікроміцети використовують органічні кислоти як джерело живлення, знижуючи тим самим кислотність корму та стимулюючи ріст аеробних гнильних бактерій. Тому для підвищення аеробної стабільності треба використовувати технологічні прийоми, спрямовані на пригнічення активного розвитку

К 1 — контроль; К 2 — обробка Sil-All 4×4; Д 1 — обробка *B. subtilis* BPT-B1; Д 2 — обробка *L. plantarum* KT-L18/1.

Рис. 1. Вміст молочної кислоти у консервованому плющеному вологому зерні кукурудзи на 70-у добу ферментації та на 14-у добу після відкриття корму.

К 1 — контроль; К 2 — обробка Sil-All 4×4; Д 1 — обробка *B. subtilis* BPT-B1; Д 2 — обробка *L. plantarum* KT-L18/1.

Рис. 2. Значення рН у консервованому плющеному вологовому зерні кукурудзи на 70-у добу ферментації та на 14-у добу після відкриття корму.

мікроміцетів. Заготівля плющеного зерна кукурудзи з пробіотичними штамами *B. subtilis* BPT-B1 та *L. plantarum* KT-L18/1, що мають антифунгальні властивості, запобігає інтенсивному розвитку мікроміцетів, гнильних мікроорганізмів і сприяє кращій аеробній стабільності корму упродовж 14 діб після доступу повітря під час відкриття корму.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

- Кулик М. Ф., Петриченко В. Ф., Ібатуллин І. І., Костенко В. М., Скоромна О. І. Виробництво, зберігання і використання кормів. Вінниця : Нова книга, 2005. 472 с.
- Голохвастова С. И. Консервирование плющеного зерна — энергосберегающая технология. *Животноводство России*. 2000. № 4. С. 23–24.
- Gunn P. J., Buckmaster D. R., Lemnager R. P., Van Emon M. L., Claeys M. C., Lake S. L. Preservation characteristics of modified wet distillers grains with solubles stored with marginal-quality feedstuffs in laboratory-scale mini silos. *Prof. Anim. Sci.* 2013. № 29. P. 671–676. [https://doi.org/10.15232/S1080-7446\(15\)30299-0](https://doi.org/10.15232/S1080-7446(15)30299-0)
- Соляник Т. В., Гласкович М. А. Микробиология. Микробиология кормов животного и растительного происхождения: курс лекций. Горки : БГСХА, 2014. 76 с.
- Queiroz O. C. M., Arriola K. G., P. Daniel J. L., Adesogan A. T. Effects of 8 chemical and bacterial additives on the quality of corn silage. *Journal of Dairy Science*. 2013. 96(9). P. 5836–5843. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6691>
- Kleinschmit D. H., Schmidt R. J., Kung L. Jr. The effects of various antifungal additives on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *Journal of Dairy Science*. 2005. 88(6). P. 2130–39. doi: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72889-7](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72889-7)
- Rodríguez A. A., Acosta Y., Rivera V. & Randel P. F. Effect of a microbial inoculant on fermentation characteristics, aerobic stability, intake, and digestibility of corn silage by rams. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 2016. 29(2). P. 108–118. doi: <https://dx.doi.org/10.17533/udea.rccp.v29n2a04>
- Косолапова Е. В. Анализ технологических приёмов заготовки и хранения консервированного плющеного зерна. *Вестник НГИЭИ*. 2014. № 4–35. С. 71–77.
- Brüning D., Gerlach K., Weiss K. & Südekum K.-H. Effect of compaction, delayed sealing and aerobic exposure on maize silage quality and on formation of volatile organic compounds. *Grass and Forage Science*. 2017. 73. P. 53–66. doi: <https://doi.org/10.1111/gfs.12288>
- da Silva N. C., Nascimento C. F., Nascimento F. A., de Resende F. D., Daniel J. L. P., Siqueira G. R. Fermentation and aerobic stability of rehydrated corn grain silage treated with different doses of *Lactobacillus buchneri* or a combination of *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus acidilactici*. *Journal of Dairy Science*. 2018. 101(5). P. 4158–4167. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13797>

11. Li X., Xu W., Yang J. et al. Effects of applying lactic acid bacteria to the fermentation on a mixture of corn steep liquor and air-dried rice straw. *Animal Nutrition*. 2016. 2(3). P. 229–33. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2016.04.003>
12. Rahman N. A., Abd Halim M. R., Mahawi N., Hasnudin H., Al-Obaidi J. R., Abdullah N. Determination of the use of *Lactobacillus plantarum* and *Propionibacterium freudenreichii* application on fermentation profile and chemical composition of corn silage. *BioMed Research International*. 2017. P. 1–8. doi: <https://doi.org/10.1155/2017/2038062>
13. Rodrigues P. H. M., Gomes R. d. C., Meyer P. M., Borgatti L. M. O., Franco F. M. J., Godoy G. L. A. D. Effects of microbial inoculants and amino acid production by-product on fermentation and chemical composition of sugarcane silages. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2012. 41(6). P. 1394–1400. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982012000600011>
14. Победнов Ю. А., Мамаев А. А. Эффективность применения бактерий вида *Bacillus subtilis* при силосовании и сенажировании трав. *Ветеринарная патология*. 2005. № 1. С. 90–96.
15. Кравченко Н. О., Передерій М. Г. Антагоністична активність штамів бактерій *Bacillus subtilis*, перспективних для створення консервантів вологого зерна плющеної кукурудзи. *Сільськогосподарська мікробіологія*. 2017. Вип. 26. С. 49–54.
16. Кравченко Н. О., Чумаченко С. П., Передерій М. Г. Консервуюча здатність *Bacillus subtilis* при заготівлі плющеного вологого зерна кукурудзи. *Сільськогосподарська мікробіологія*. 2017. Вип. 25. С. 57–62.
17. Queiroz O. C. M., Adesogan A. T., Arriola K. G., Queiroz M. F. S. Effect of a dual-purpose inoculant on the quality and nutrient losses from corn silage produced in farm-scale silos. *Journal of Dairy Science*. 2012. Vol. 95, № 6. P. 3354–3362.
18. Балпанов Д. С., Тен О. А., Есепбай Г. Е., Барбасова С. К. Технология получения закваски для силосования грубостебельчатых кормов с использованием молочнокислых и пропионово-кислых бактерий. *Биотехнология. Теория и практика*. 2014. № 1. С. 79–84.
19. Штам бактерій *Bacillus subtilis* для виготовлення пробіотичних препаратів для тварин та мікробних препаратів для кормовиробництва: пат. 116292 Україна. МПК C12N 1/20, C12R 1/125, Н. О. Кравченко, О. М. Дмитрук, В. О. Агеев, Л. В. Божок; заявник і патентовласник: Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН. № 2016 06595; заявл. 16.06.2016; опубл. 26.02.2018, Бюл № 4.
20. Штам бактерій *Lactobacillus plantarum* для виготовлення пробіотичних препаратів та мікробних консервантів для кормовиробництва: пат. 115938 Україна. МПК C12N 1/20, A61K 35/744, Н. О. Кравченко, О. М. Дмитрук, В. О. Агеев, Л. В. Божок; заявник і патентовласник: Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН. № 2016 06596; заявл. 16.06.2016; опубл. 10.01.2018, Бюл № 1.
21. de Mann J. C., Rogosa M., Sharpe M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. bacteriology*. 1960. 23 (1). P. 130–135. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>
22. Спосіб виготовлення пробіотичного препарату бацилярного субтилісу: пат. на кор. мод. 66420 Україна. МПК A61K 35/66, С. В. Дерев'янка, Г. М. Дяченко, Л. В. Божок, В. О. Агеев, О. І. Прокопенко; заявник і патентовласник: Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН. № 201101195 заявл. 03.02.2011; опубл. 10.01.2012, Бюл. № 1.
23. Оследкин Ю. С., Васин А. Д., Шушунова А. В. Закваска для силосования кормов. *Ветеринария*. 1981. № 9. С. 65–66.
24. Егоров Н. С. Микробы-антагонисты и биологические методы определения антибиотической активности. М. : Высш. Школа, 1965. 211с.
25. Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках: учеб. для студ. биол. спец. ун-тов. 4-е изд., перераб. и доп. М. : Высш. шк., 1986. 448 с.
26. Петухова Е. А., Бессарабова Р. Ф., Халенева Л. Д., Антонова О. А. Зоотехнический анализ кормов 2-е изд., доп. и перераб. М. : Агропромиздат, 1989. 239 с.
27. Коросов А. В., Коросов А. В., Горбач В. В. Компьютерная обработка биологических данных. Петрозаводск : ПетрГУ, 2016. 96 с.
28. Смирнов В. В., Резник С. Р., Василевская И. А. Спорообразующие аэробные бактерии — продуценты биологически активных веществ. К. : Наукова думка, 1982. 278 с.
29. Квасников Е. И., Нестеренко О. А. Молочнокислые бактерии и пути их использования. 1975. 392 с.

Отримано 17.06.2020

MICROBIOLOGICAL EVALUATION OF ROLLED MOIST CORN GRAIN FERMENTED BY PROBIOTIC MICROORGANISM STRAINS

N. O. Kravchenko, M. H. Perederii, O. M. Dmytruk

Institute of Agricultural Microbiology and Agroindustrial Manufacture, NAAS, Chernihiv
e-mail: nat.probiotik@gmail.com

Objective. Study the influence of *Bacillus subtilis* and probiotic strains of lactic acid bacteria on microbiological processes during fermentation of rolled moist corn grain. **Methods.** Microbiological, zootechnical. **Results.** The antifungal activity of probiotic strains of *Bacillus subtilis* BPT-B1 and *Lactobacillus plantarum* KT-L18/1 against micromycetes isolated from rolled moist corn grain was studied. It has been established that *B. subtilis* BPT-B1 actively inhibits the growth of moulds of the genera *Mucor*, *Rhizopus* and *Penicillium* and yeasts of the genera *Sacharomyces* and *Torulopsis*. *L. plantarum* KT-L18/1 shows weak antifungal activity, pronounced antagonism is only observed against micromycetes of the genus *Penicillium* and yeast of the genus *Torulopsis*. Under exposure to *B. subtilis* BPT-B1 and *L. plantarum* KT-L18/1, was a 3-fold increase in the number of lactic acid bacteria on a day 70 compared to the same parameter in the baseline raw material; no butyric acid bacteria, moulds and pathogenic microorganisms were detected. When air flow is available for prepared moist corn, the development of micromycetes is observed within 14 days in all variants, except for inoculation of raw materials with *L. plantarum* KT-L18/1. At the same time, the number of micromycetes increased 2.4 times in the moist corn without the introduction of preservatives, which increases the probability of accelerated aerobic spoilage of feed and the threat of contamination with mycotoxins. Feed acidity both on a day 70 of preservation and on a day 14 from the beginning of air access in variants with the introduction of probiotic strains of *B. subtilis* BPT-B1 and *L. plantarum* KT-L18/1 and biopreservative Sil-All 4×4 was stably optimal within pH 4.0 to 4.3. In a preserved rolled moist corn grain without introduction of preservative, pH of the feed increased from 4.6 to 5.2, which is favourable for the active development of aerobic microflora. **Conclusions.** Making of rolled moist corn grain treated with *B. subtilis* BPT-B1 and *L. plantarum* KT-L18/1 ensures the establishment of optimal levels of feed acidity, prevents the intensive development of putrefactive microorganisms, micromycetes, which contributes to better aerobic stability of feed for 14 days after access of air compared with feed without the use of probiotic microorganisms; saturates the moist corn with probiotic microflora beneficial for animals.

Key words: rolled corn grain, preservation, biological preservatives, probiotic bacteria, lactic acid bacteria, micromycetes.

REFERENCES

1. Kulyk, M. F., Petrychenko, V. F., Ibatullin, I. I., Kostenko, V. M., Skoromna, O. I. (2005). *Vyrobnyctvo, zberigannja i vykorystannja kormiv* [Production, storage and use of feed]. Vinnycja: Nova knyha [in Ukrainian].
2. Golohvastova, S. I. (2000). *Konservirovane pljushhenogo zerna — jenergosberegajushhaja tehnologija* [Rolled Grain Canning — Energy Saving Technology]. *Zhivotnovodstvo Rossii — Animal Husbandry in Russia* [in Russian].
3. Gunn, P. J., Buckmaster, D. R., Lemenager, R. P., Van Emon, M. L., Claeyes, M. C. & Lake, S. L. (2013). Preservation characteristics of modified wet distillers grains with solubles stored with marginal-quality feedstuffs in laboratory-scale mini silos. *Prof. Anim. Sci.*, 29, 671–676. [https://doi.org/10.15232/S1080-7446\(15\)30299-0](https://doi.org/10.15232/S1080-7446(15)30299-0)
4. Soljanyk, T. V., Glaskovych, M. A. (2014). *Mykrobiologija. Mykrobiologija kormov zhyvotnogo y rastytel'nogo proyshozhdenija* [Microbiology. Microbiology of animal and plant feed]. Gorky: BGSHA [in Russian].
5. Queiroz, O. C. M., Arriola, K. G., P. Daniel, J. L., & Adesogan, A. T. (2013). Effects of 8 chemical and bacterial additives on the quality of corn silage. *Journal of Dairy Science*, 96(9), 5836–5843. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6691>
6. Kleinschmit, D. H., Schmidt, R. J., & L. Kung, Jr. (2005). The effects of various antifungal additives on the fermentation and aerobic stabil-

ity of corn silage. *Journal of Dairy Science*, 88(6), 2130–2139. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72889-7](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72889-7)

7. Rodríguez, A. A., Acosta, Y., Rivera, V., & Randel, P. F. (2016). Effect of a microbial inoculant on fermentation characteristics, aerobic stability, intake, and digestibility of corn silage by rams. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 29(2), 108–118. <https://dx.doi.org/10.17533/udea.rccp.v29n2a04>

8. Kosolapova, E. V. (2014). Analiz tehnologicheskikh priemov zagotovki i hranenija konservirovanogo pljushhenogo zerna [Analysis of technological methods of harvesting and storage of canned rolled grain]. *Vestnik NGIeI — Herald NGIEI*, 4–35, 71–77 [in Russian].

9. Brüning, D., Gerlach, K., Weiss, K., & Südekum, K.-H. (2017). Effect of compaction, delayed sealing and aerobic exposure on maize silage quality and on formation of volatile organic compounds. *Grass and Forage Science*, 73, 53–66. <https://doi.org/10.1111/gfs.12288>

10. da Silva, N. C., Nascimento, C. F., Nascimento, F. A., de Resende, F. D., Daniel, J. L. P., & Siqueira, G. R. (2018). Fermentation and aerobic stability of rehydrated corn grain silage treated with different doses of *Lactobacillus buchneri* or a combination of *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus acidilactici*. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 4158–4167. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13797>

11. Li, X., Xu W., & Yang, J. (2016). Effects of applying lactic acid bacteria to the fermentation on a mixture of corn steep liquor and air-dried rice straw. *Animal Nutrition*, 2(3), 229–33. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2016.04.003>

12. Rahman, N. A., Abd Halim, M. R., Mahawi, N., Hasnudin, H., Al-Obaidi, J. R., & Abdullah, N. (2017). Determination of the use of *Lactobacillus plantarum* and *Propionibacterium freudenreichii* application on fermentation profile and chemical composition of corn silage. *BioMed Research International*, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2017/2038062>

13. Rodrigues, P. H. M., Gomes, R. d. C., Meyer, P. M., Borgatti, L. M. O., Franco, F. M. J., & Godoy, G. L. A. D. (2012). Effects of microbial inoculants and amino acid production by-product on fermentation and chemical composition of sugarcane silages. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 41(6), 1394–1400. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982012000600011>

14. Pobednov, Ju. A., & Mamaev, A. A. (2005). Jeffectivnost' primenenija bakterij vida *Bacillus subtilis* pri silosovanii i senazhirovanii travu. [The effectiveness of the use of bacteria of the species *Bacillus subtilis* in ensiling and grass haying]. *Veterinarnaja patologija — Veterinary Pathology*, 1, 90–96 [in Russian].

15. Kravchenko, N. O., & Perederij, M. G. (2017). Antagonistychna aktyvnist' shtamiv bakterij

Bacillus subtilis, perspektyvnyh dlja stvorennja konservativ vologogo zerna pljushhenoi' kukurudzy [Antagonistic activity of *Bacillus subtilis* strains, perspective components for creation of rolled high-moisture corn preservatives]. *Silskogospodarska mikrobiologija — Agricultural microbiology*, 26, 49–54 [in Ukrainian]. http://www.sg-microb.ho.ua/arh/pdf26/SM26_08.pdf

16. Kravchenko, N. O., Chumachenko, S. P., & Perederij, M. G. (2017). Konservujucha zdatsnist' *Bacillus subtilis* pry zagotivli pljushhennogo vologogo zerna kukurudzy [Preserving ability of *Bacillus subtilis* during gathering of flattened moist corn grain]. *Silskogospodarska mikrobiologija — Agricultural microbiology*, 25, 57–62 [in Ukrainian]. http://www.sg-microb.ho.ua/arh/pdf25/SM25_09.pdf

17. Queiroz, O. C. M., Adesogan, A. T., Arriola, K. G., & Queiroz, M. F. S. (2012). Effect of a dual-purpose inoculant on the quality and nutrient losses from corn silage produced in farm-scale silos. *Journal of Dairy Science*, 95(6), 3354–3362. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5207>

18. Balpanov, D. S., Ten, O. A., Esepaj, G. E., & Barbasova, S. K. (2014). Tehnologija poluchenija zakvaski dlja silosovanija grubostebel'chatyh kormov s ispol'zovaniem molochnokislih i propionovokislyh bakterij [The technology for producing starter culture for silage of coarse-grained feed using lactic acid and propionic acid bacteria.]. *Biotehnologija. Teorija i praktika — Biotechnology. Theory and practice*, 1, 79–84 [in Russian].

19. Pat. 116292 UA. МІІК: C12N 1/20, C12R 1/125. Strain of bacteria *Bacillus subtilis* for the manufacture of probiotic preparations for animals and microbial preparations for fodder production, Kravchenko, N. O., Dmytruk, O. M., Aheyev, V. O., Bozhok, L. V., Publ. 26.02.2018 [in Ukrainian].

20. Pat. 115938 UA. МІІК: C12N 1/20, A61K 35/744. Strain of bacteria *Lactobacillus plantarum* for the manufacture of biotic drugs and microbial preservatives for feed digestion, Kravchenko, N. O., Dmytruk, O. M., Aheyev, V. O., Bozhok, L. V., Publ. 10.01.2018 [in Ukrainian].

21. de Mann, J. C., Rogosa, M., & Sharpe, M. E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriology*, 23(1), 130–135. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>

22. Pat. 66420 UA, МІІК A61K 35/66. Method of manufacturing probiotic preparation of *Bacillus subtilis*, Derevianko, S. V., Dyachenko, A. M., Bozhok, L. V., Aheyev, V. O., Prokopenko, O. I., Publ. 10.01.2012 [in Ukrainian].

23. Osledkin, Ju. S., Vasin, A. D., & Shushunova, A. V. (1981). Zakvaska dlja silosovanija kormov [Sourdough silage feed]. *Veterinarija — Veterinary*, 9, 65–66 [in Russian].

24. Egorov, N. S. (1965). *Mikroby-antagonisty i biologicheskie metody opredelenija antibioticheskoy*

aktivnosti [Microbes-antagonists and biological methods for determining antibiotic activity]. Moskva: Vyssh. Shkola [in Russian].

25. Egorov, N. S. (1986). *Osnovy uchenija ob antibiotikah: ucheb. dlja stud. biol. spec. un-tov.* 4-e izd., pererab. i dop. [Antibiotic Fundamentals]. Moskva: Vyssh. shk. [in Russian].

26. Petuhova, E. A., Bessarabova, R. F., Hale-neva, L. D., Antonova, O. A. (1989). *Zootehnycheskij analiz kormov* [Zootechnical analysis of feeds]. Moskva: Agropromizdat [in Russian].

27. Korosov, A. V., Gorbach, V. V. (2016) *Komp'juternaja obrabotka byologicheskijh dannjah*

[Computer processing of biological data] (pp. 96). Petrozavodsk: PetrGU [in Russian].

28. Smirnov, V. V., Reznik, S. R., Vasilevska-ja, I. A. (1982). *Sporoobrazujushhie aerobne bakterii — producenty biologicheskijh aktivnyh veshhestv* [Spore-forming aerobic bacteria are producers of biologically active substances]. Kyiv: Naukova dumka [in Russian].

29. Kvasnikov, E. I., Nesterenko, O. A. (1975). *Molochnokislye bakterii i puti ih ispol'zovanija* [Lactic acid bacteria and ways of their use] [in Russian].

Received 17.06.2020