

МІКРОБІОЛОГІЧНІ ПРОЦЕСИ У СІНАЖІ З ЛЮЦЕРНИ ЗА ІНОКУЛЯЦІЇ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ

Н. О. Кравченко, О. М. Дмитрук

Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН
вул. Шевченка, 97; м. Чернігів, 14030, Україна; e-mail: nat.probiotik@gmail.com

Мета. Охарактеризувати вплив молочнокислих бактерій (МКБ) на кількісний та якісний склад угруповань мікроорганізмів сінажу з люцерни за їх інтродукції. **Методи.** Мікробіологічні (культивування мікроорганізмів на різних середовищах, визначення їхньої життєздатності, встановлення осмотолерантності, визначення кількості молочної кислоти за культивування на знежиреному стерильному молоці), мікроскопічні, лабораторні дослідження із сінажування люцерни за вмісту сухої речовини (СР) 46 % та 37 % з інокуляцією штамів МКБ та без інокуляції, статистичні. **Результати.** Інокуляцію люцерни проведено монокультурами осмотолерантних штамів *Lactobacillus* sp. LH42, *Lactobacillus* sp. LH43, *Lactobacillus* sp. LH47, *L. plantarum* KT-L18/1, що проявили у 100 % випадків толерантність до 2 %, 4 %, 6,5 % хлориду натрію. Найкращі показники за активною та титрованою кислотністю встановлено у культур *Lactobacillus* sp. LH47, *L. plantarum* KT-L18/1. Інокуляція МКБ у сінажну екосистему на 15-ту добу ферментації вплинула на збільшення проти контролю без обробки чисельності МКБ. На 45-ту добу сінажування люцерни чисельність МКБ знизилася та відзначалася на рівні від 1 до 100 млрд КУО/г за вмісту СР 46 % та на рівні від 0,01 до 10 млрд КУО/г за вмісту СР 37 %. Найбільший розвиток клостридій у сінажі з люцерни у дослідках спостерігався на третю добу з різким зменшенням їх чисельності на 45-ту добу. Показано вплив *Lactobacillus* sp. LH 43, *Lactobacillus* sp. LH 47, *L. plantarum* KT-L18/1 на зменшення росту чисельності клостридій як за вмісту СР 46 %, так і 37 % наприкінці терміну ферментації. Встановлено вищу чисельність дріжджів за більш низького (37 %) вмісту СР у сінажі. Встановлено фунгістатичний ефект у варіантах з інокуляцією МКБ, як порівняти з контрольним варіантом. Показано співвідношення динаміки зниження активної кислотності (рН) з динамікою розвитку мікробіоти. **Висновки.** Інокуляція досліджуваних штамів молочнокислих бактерій у високобілкову сінажну масу люцерни сприяла збільшенню чисельності МКБ на порядки проти контрольного варіанту, пригніченню розвитку клостридій, дріжджів та швидкому зниженню активної кислотності, що підтверджує інформацію щодо впливу інокулянтів на основі МКБ на ферментацію рослинної сировини шляхом корегування складу угруповань мікроорганізмів.

Ключові слова: молочнокислі бактерії, люцерна, сінаж, ферментація, клостридії, мікроміцети.

Вступ. Сутність силосування та сінажування рослинної сировини полягає у трансформації цукрів у низькомолекулярні органічні кислоти за збереження переважної більшості поживних компонентів, особливо кормового білка. Білок бобових культур, зокрема люцерни, за амінокислотним складом

є більш повноцінним, ніж злакових. Проте наявність в люцерні високого вмісту білка та пектину на фоні низького вмісту рослинних цукрів визначає її приналежність до культур, які не піддаються силосуванню. З цієї причини люцерну рекомендують використовувати для заготівлі сінажу [1–3]. Сінаж — це

спеціальний корм для тварин, який готують з рослинної сировини, доведеної до вологості близько 50 %. Зневоднення сировини сінажу до певної межі (так звана «фізіологічна сухість»), за якою стає критичним можливість поглинання бактеріями води, є фактором, що пригнічує розвиток мікроорганізмів, які викликають гниття сінажу. З іншого боку, «фізіологічна сухість» сировини за сінажування не стримує розвиток плісняви, оскільки плісняві гриби, як порівняти з бактеріями, мають значно більшу сисну силу. Тому важливою умовою для сінажування, як і для силосування, є створення анаеробних умов зберігання прив'язаної маси. У якісному сінажі внаслідок забезпечення оптимальної вологості сировини не відбувається маслянокисле, майже не спостерігається оцтове бродіння, обмежений розвиток гнильної мікрофлори [4]. За такої вологості, хоч значно повільніше, ніж у силосі, відбувається розвиток молочнокислих бактерій. Втім, за деякими даними, сінаж з люцерни не завжди можливо заготовити вільним від масляної кислоти. Тобто як під час силосування, так і під час сінажування рослинної сировини основним видом псування може бути маслянокисле бродіння, особливо за слабого підкислення [5]. виправити цей недолік можна за рахунок прискорення підкислення до граничних значень, що унеможливить розвиток маслянокислих бактерій у сінажі з люцерни [6].

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Рослинна сировина, призначена для консервування, містить на своїй поверхні різноманітні аеробні та анаеробні мікроорганізми. Склад епіфітної мікробіоти залежить від виду сировини, факторів навколишнього середовища (погода під час збирання, агротехніка та технологія збирання). Саме епіфітні мікроорганізми визначають спрямованість ферментації консервованої сировини через кількість та тип синтезованих органічних кислот, що безпосередньо впливає на якість та стабільність отриманого корму [7; 8]. За сприятливих умов у процесі сінажування рослинної сировини склад панівної мікробіоти може швидко змінитися — від небажаних до епіфітних молочнокислих бактерій [9; 10]. Мікробіота сінажу, що належить до молочнокислих бактерій та є бажаною для процесу ферментації, виявляється у невели-

кій кількості: від 10 КУО/г до 1×10^7 КУО/г [11]. Її склад представлено бактеріями родів *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus* [12–14]. Серед мікробіоти, яка є небажаною для якісного бродіння корму, виділяються мікроорганізми, що належать до анаеробних бактерій роду *Clostridium*, аеробних бактерій роду *Bacillus*, бактерій родів *Listeria*, *Salmonella*, *Enterococcus*, *Pseudomonas* [15; 16]. Через здатність виробляти токсичні для людей та тварин вторинні метаболіти присутність їх у кормі створює загрозу безпеці харчових продуктів [15; 17; 18]. Збільшенню чисельності небажаної мікробіоти сприяє тривале сушіння рослинної сировини перед збиранням, поява дощів або високих температур під час сушіння, забруднення кормів ґрунтом та використання високих доз добрив [20]. Для покращення якості ферментації корму в такій ситуації рекомендують використовувати силосні закваски.

Мікробний склад ферментованої люцерни є більш різноманітним, ніж силос із зернових, що на фоні низької кількості молочнокислих бактерій (інколи не більше ніж 10 КУО/г) спричиняє розвиток небажаних мікроорганізмів і може слугувати джерелом патогенної або іншої небажаної мікробіоти, особливо, якщо мало місце порушення технології заготівлі корму [18; 19; 21; 22]. Мікроміцети також представляють велику групу мікроорганізмів, що входять до складу мікробіоти з сінажу люцерни, особливо в останні терміни його ферментації [13; 19]. Зміни у мікробіомі сінажу з люцерни тісно пов'язані з особливостями ферментації сировини, оскільки така екосистема постійно змінюється за дії антропогенних чинників [16]. Тому актуальним є пошук молочнокислих бактерій, які б ефективно обмежували розвиток небажаної мікробіоти за сінажування такої високобілкової сировини, як люцерна [11].

Мета досліджень. Охарактеризувати вплив молочнокислих бактерій на кількісний і якісний склад угруповань мікроорганізмів сінажу з люцерни за їх інтродукції.

Матеріали і методи. Об'єктами дослідження були штам *Lactobacillus plantarum* КТ-L18/1, виділений із шлунково-кишкового тракту молодняка великої рогатої худоби та депонований у Депозитарії Державного науково-контрольного інституту біотехнології, а також культури МКБ, виділені з сінажу

люцерни, для визначення родової належності яких використовували традиційні мікробіологічні методи [23; 24].

Визначення життєздатності МКБ проводили методом граничних розведень [25]. В умовах стерильності 1 мл культури МКБ переносили у мірну колбу місткістю 100 мл, доливали до мітки стерильну водогінну воду кімнатної температури і ретельно перемішували, отримуючи розведення 10^{-2} . З дотриманням правил асептики готували низку послідовних десятикратних розведень до 10^{-7} . З розведень 10^{-6} та 10^{-7} відбирали по 5 мл рідини, вносили її у 95 мл попередньо розплавленого і охолодженого до $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ капустиного агару та ретельно перемішували стерильною скляною паличкою. Отриману суміш розливали по 20 мл у стерильні чашки Петрі. Чашки після застигання середовища поміщали на 48–72 годин у термостат за температурі $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, після чого здійснювали облік результатів.

Для визначення кількості кислоти, що накопичується в процесі культивування МКБ, використовували стерильне знежирене молоко. У пробірці із середовищем вносили $0,1\text{ см}^3$ культури та культивували 14 діб за $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Після інкубації розбовтували згусток та відбирали 5,0 мл у колбу. Додавали 2–3 краплини розчину фенолфталеїну і титрували розчином натрію гідроксиду (NaOH) з концентрацією 0,1 моль/мл до появи рожевого забарвлення. Кількість мілілітрів розчину натрію гідроксиду, що пішла на титрування, множили на 20, отримуючи значення кислотності у градусах Тернера [26].

Осмолерантність МКБ вивчали шляхом визначення їх стійкості до натрію хлориду. Здатність рости у присутності NaCl досліджували на рідкому середовищі МРС з додаванням солі у концентрації 2 %, 4 %, 6,5 %. Стійкість визначали за рівнем накопичення біомаси за оптимальної температури [27].

Для проведення мікробіологічних досліджень відбирали середні проби досліджуваного сінажу, ретельно перемішували та готували з них розведення однорідних суспензій на стерильній водогінній воді. Чисельність мікробіотів визначали на середовищі Сабу-ро шляхом культивування поверхневих посівів розведень суспензій упродовж 3–4 діб (за необхідності — 7–8 діб) за температури $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Чисельність клостридій вста-

новлювали на залізо-сульфітному агарі за кількістю чорних колоній, що виростили у глибині середовища культивування упродовж 24 год. за $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Чисельність МКБ встановлювали на середовищі де Мана (MRS) та капустиному агарі з крейдою, підраховуючи кількість колоній через 2–7 діб культивування за $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ [28].

В умовах лабораторії проводили два досліді із сінажування люцерни з інокуляцією досліджуваних штамів МКБ. Люцерну після скошування у фазі початку бутонізації пров'ялювали до вмісту СР 46 % (Дослід І) та 37 % (Дослід ІІ), закладали на сінажування зі створенням анаеробних умов у поліетиленові пакети з застіркою ємністю 0,5 л. Для інокуляції використовували суспензії штамів *Lactobacillus* sp. LH 42, *Lactobacillus* sp. LH 43, *Lactobacillus* sp. LH 47, *L. plantarum* КТ-L18/1 з титром 10^8 КУО/мл. Зразки витримували у темному прохолодному місці упродовж 45 діб. На 3, 15 та 45-ту добу проводили відбір проб для мікробіологічних досліджень. На 45-ту добу визначали активну кислотність (рН) консервованого корму шляхом потенціометричного вимірювання на рН-метрі рН-150МИ.

Отримані результати статистично обробляли за використання пакета прикладних програм Microsoft Office та представляли у вигляді середніх значень та їх похибок ($M \pm m$).

Результати та їх обговорення. В процесі сінажування люцерни мікробіом може піддаватися осмонапруженності, що зумовлена сконцентрованими у разі прив'ялювання компонентами рослинного соку та низькомолекулярними продуктами гідролізу рослинних полімерів. У зв'язку з цим оцінка осмотолерантності МКБ дає можливість відбору найбільш толерантних з них для створення силосних заквасок для сінажування. Досліджувані штами *Lactobacillus* sp. LH42, *Lactobacillus* sp. LH43, *Lactobacillus* sp. LH47, *L. plantarum* КТ-L18/1 проявили у 100 % випадків толерантність до 2 %, 4 %, 6,5 % NaCl.

Результати дослідження МКБ за ступенем накопичення молочної кислоти за культивування на стерильному знежиреному молоці представлено в табл. 1.

Найкращі показники за активною та титрованою кислотністю встановлено у культур *Lactobacillus* sp. LH 47 і *L. plantarum* КТ-L18/1.

Таблиця 1. Активна та титрована кислотністю МКБ за культивування у стерильному знежиреному молоці

Штами бактерій	pH	Титрована кислотність, °Т
<i>Lactobacillus</i> sp. LH 42	5,8 ± 0,0	41,3 ± 2,4
<i>Lactobacillus</i> sp. LH 43	5,5 ± 0,4	44,0 ± 6,1
<i>Lactobacillus</i> sp. LH 47	5,2 ± 0,3	82,0 ± 5,0
<i>L. plantarum</i> KT-L18/1	5,5 ± 0,0	72,6 ± 9,7

У ферментації люцерни угруповання мікробіоти відіграє важливу роль. Його склад залежить від впливу низки чинників — вмісту сухої речовини, терміну прив'ялювання, наявності інокулянтів. У наших дослідках із сінажування люцерни ми вивчали вплив перспективних МКБ на епіфітну мікробіоту за різного вмісту СР: 46 % та 37 % (рис. 1 і 2). Максимальний рівень чисельності МКБ у сінажі з люцерни як за вмісту СР 46 %, так і 37 % спостерігали на 15-ту добу.

Інтродукція перспективних лактобацил у сінажну екосистему вплинула на збільшення на порядки чисельності МКБ. У досліді II найбільшу чисельність МКБ на рівні 700 млрд КУО/г спостерігали за обробки си-

ровини *L. plantarum* KT-L18/1 (рис.1).

У досліді I найбільший граничний ступінь МКБ відзначали за інокуляції *Lactobacillus* sp. LH 47 на рівні 500 млрд КУО/г (рис. 2). Закономірно, що до 45-ї доби сінажування люцерни в усіх варіантах обох дослідів чисельність МКБ знизилася до рівня від 1 до 100 млрд КУО/г за вмісту СР 46 % та до рівня від 0,9 до 10 млрд КУО/г за вмісту СР 37 %.

Одними із мікроорганізмів, що викликають псування корму та сприяють накопиченню масляної кислоти, є представники роду *Clostridium*. Найбільш інтенсивний розвиток клостридій за сінажування люцерни в обох дослідках спостерігали на третю добу з різким зменшення їх чисельності на 45-ту добу (рис. 3 і 4). За вмісту у сінажі СР 46 % чисельність клостридій за інокуляції МКБ на третю добу спостерігалася на рівні 0,1–50 млрд КУО/г з різким зниженням на 45-ту добу до нульового рівня за інокуляції *Lactobacillus* sp. LH 43, *Lactobacillus* sp. LH 47, *L. plantarum* KT-L18/1. За СР 37 % на третю добу сінажування у варіантах з інокуляцією МКБ чисельність клостридій зросла та відзначалася в межах 10 млн — 50 млрд КУО/г. До 45-ї доби ферментації кількість клостридій різко знизилася по всіх варіантах і була на рівні 60 і 10 млн КУО/г у варіанті без обробки сировини та за інокуляції *Lactobacillus* sp. LH 42 відповідно. За обробки субстрату *Lactobacillus* sp. LH 43, *Lactobacillus* sp. LH 47,

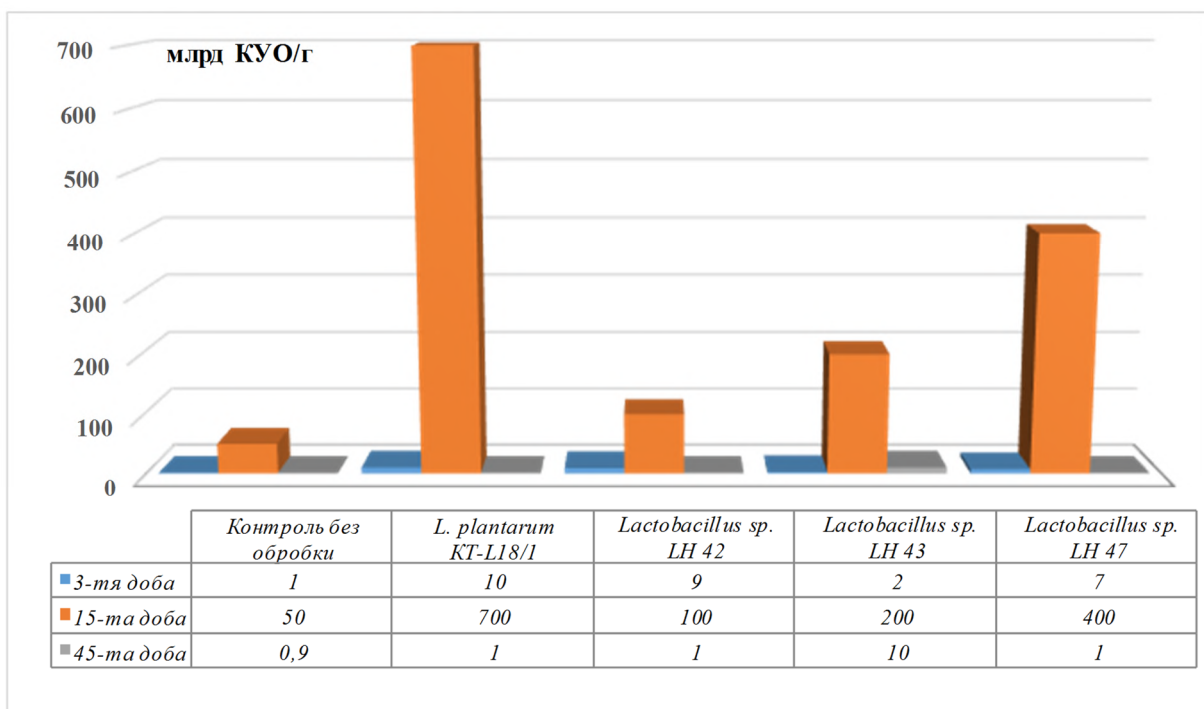


Рис. 1. Чисельність МКБ у сінажі з люцерни за вмісту СР 37 %.

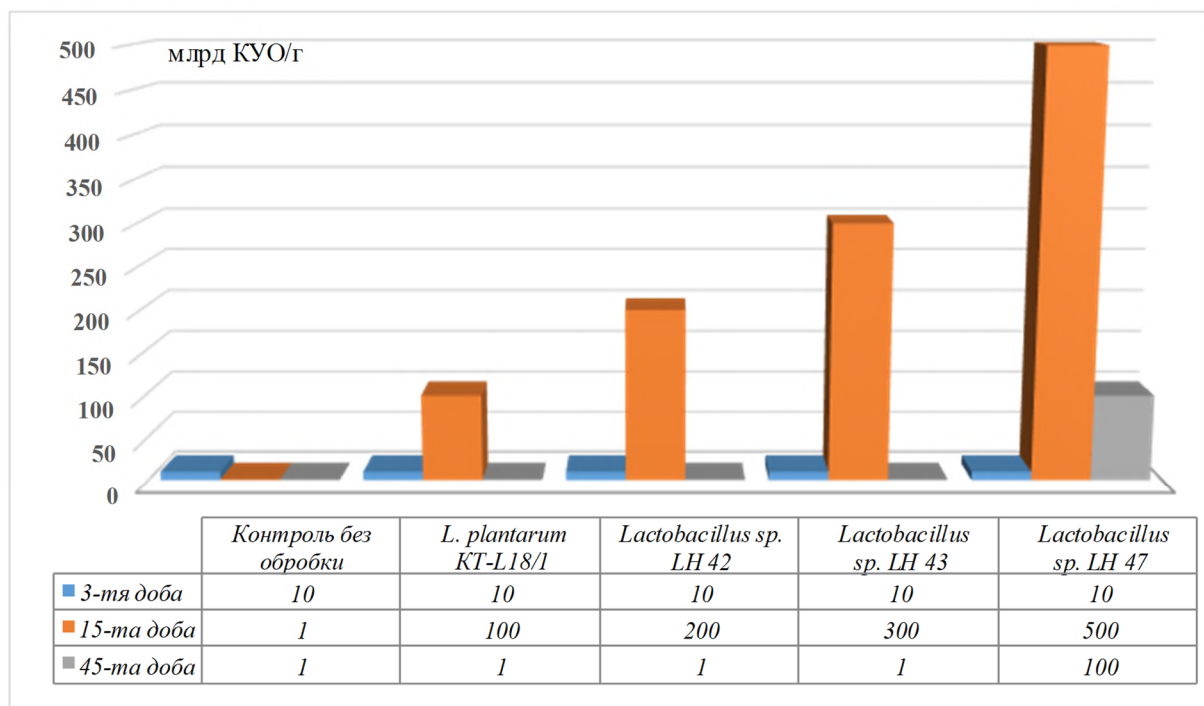


Рис. 2. Чисельність МКБ у сінажі з люцерни за вмісту СР 46 %.

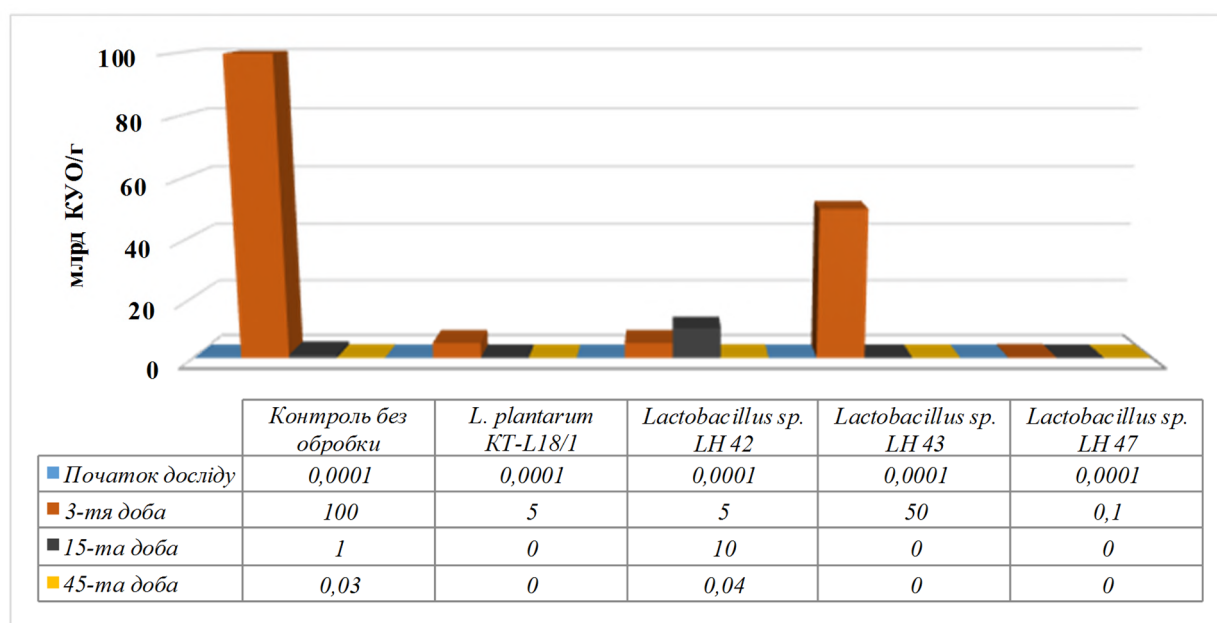


Рис. 3. Чисельність клостридій у сінажі з люцерни за вмісту СР 46 %.

L. plantarum KT-L18/1 клостридій наприкінці дослідів не виявлено. Найменшу чисельність клостридій за вмісту СР 46 % та 37 % виявлено у варіантах за обробки сінажу з люцерни *Lactobacillus* sp. LH 43, *Lactobacillus* sp. LH 47, *L. plantarum* KT-L18/1.

Важливою характеристикою МКБ, що застосовують як основу для інокулянтів, є їхній пригнічувальний вплив на ріст мікроміцетів, зокрема дріжджів. Динаміка розвитку дріжджів у сінажі з люцерни за високого вмісту СР (46 %) як у варіантах за інокуляції

МКБ, так і без характеризувалася максимальним ростом на 3-тю добу сінажування (понад 10^7 КУО/г). На 15-ту добу вони виявлялися лише у кількості 10^3 КУО/г, а до 45-тої доби мікроскопічні гриби виявляли лише у двох варіантах, один із яких — контрольний.

Характер розвитку дріжджів у сінажі за вмісту СР 37 % був більш бурхливим, їх чисельність максимально зросла на третю добу (від 5×10^6 КУО/г до 20×10^6 КУО/г) і трималася на такому рівні до 15-ї доби консервування. Проте до 45-ї доби кількість

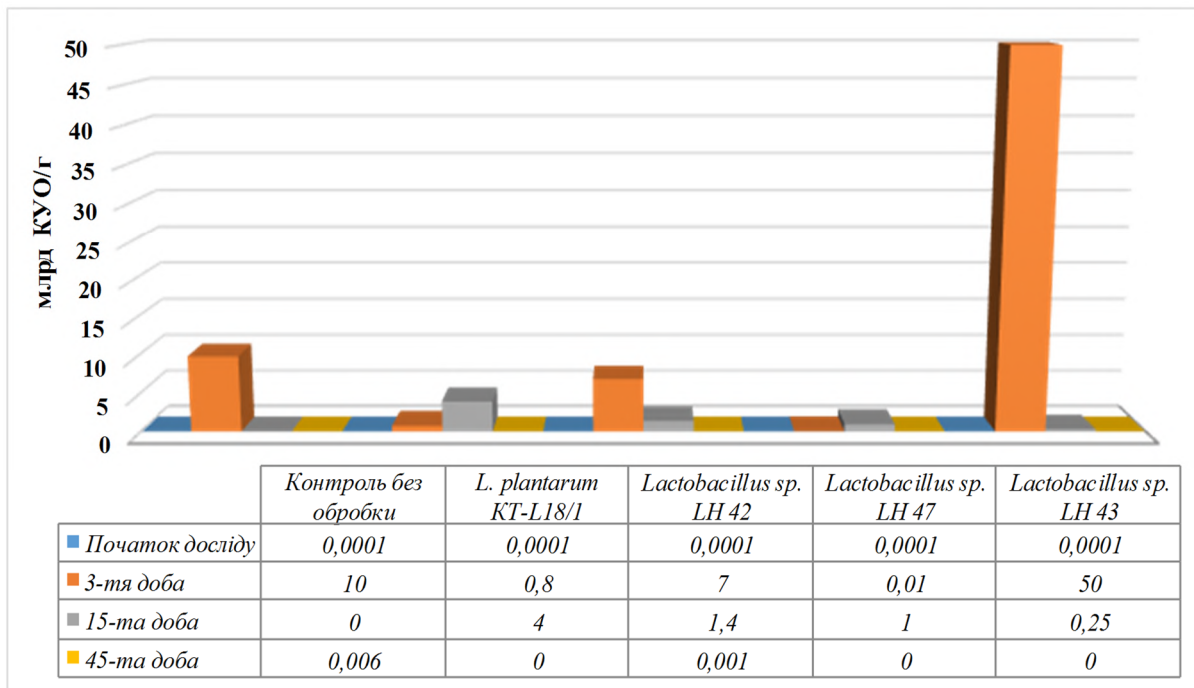


Рис. 4. Чисельність клостридій у сінажі з люцерни за вмісту СР 37 %.

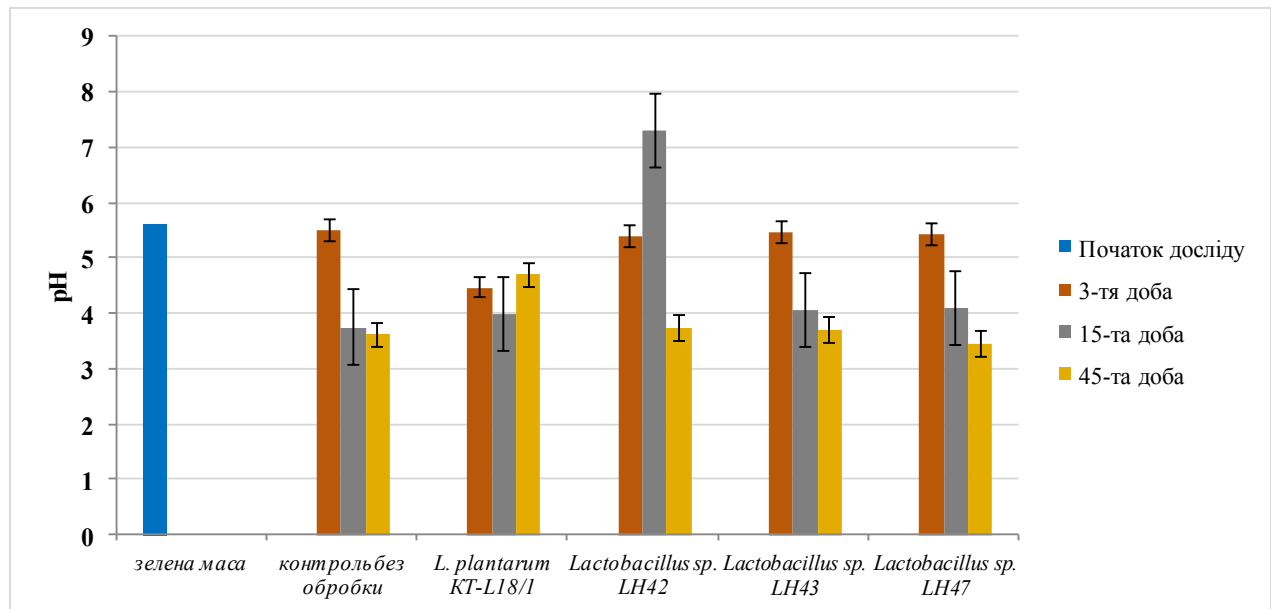
дріжджів у варіантах сінажу дослідю II знизилася до 10^4 КУО/г як у варіантах з обробкою МКБ, так і у контрольному варіанті. Отже, за більш низького (37 %) вмісту СР чисельність дріжджів була значно вищою. Значущого впливу МКБ на ріст дріжджів не виявлено, спостерігали лише фунгістатичний ефект у варіантах з інокуляцією МКБ проти контрольного варіанту.

Треба відзначити, що динаміка розвитку мікробної екосистеми сінажу люцерни в обох дослідях співвідносилася з динамікою рН. За СР 46 % на третю добу сінажування рН у варіантах з інокуляцією МКБ визначалась на рівні 5,47–4,47 проти контролю без інокуляції 5,49 (рис. 5, а). Саме за цих показників активної кислотності спостерігали максимальну чисельність клостридій та мікроміцетів. На 15-ту добу рН знизилася у всіх варіантах до 4,1–3,98 та трималася до 45-ї доби в оптимальних для сінажу значеннях, не виходячи за межі 4,7. Швидкість зниження рН сінажу за вмісту СР 37 % була сповільнена і навіть на 15-ту добу експерименту перебувала у межах 7,5–7,7 (за винятком варіанту з обробкою *Lactobacillus* sp. LH 43, зі значенням 5,0) проти рН люцерни на початку сінажування 5,6 (рис. 5, б). За вмісту СР 37 % чисельність клостридій у сінажі була у межах 0,25–4,0 млрд КУО/г. Проте на кінець терміну спостереження рН відповідала оптимальним для сінажу значенням у межах

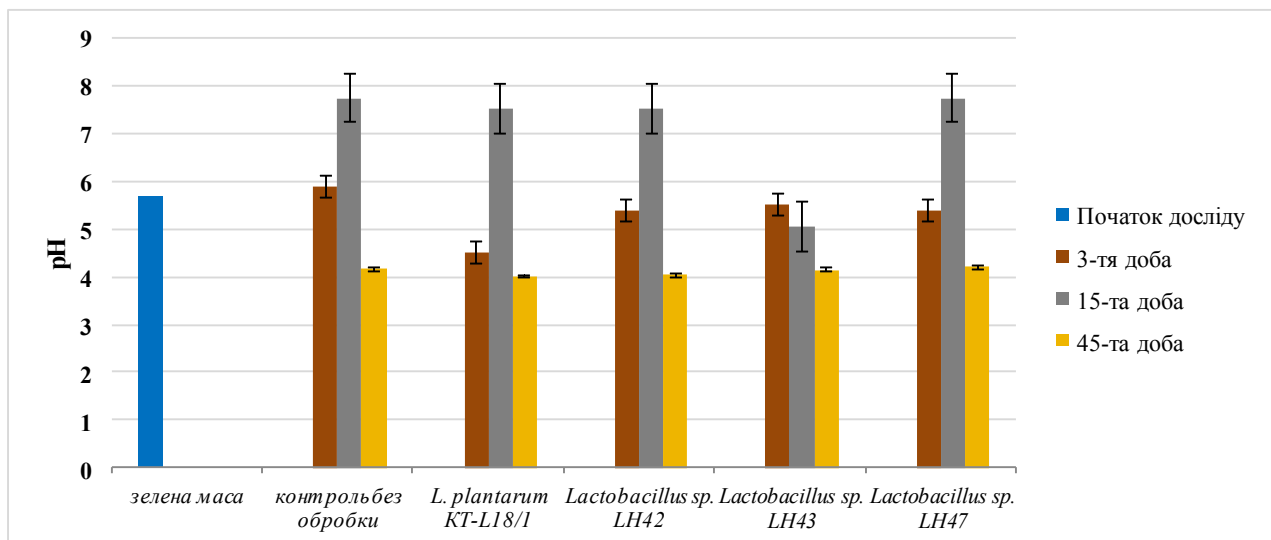
4,0–4,17 як у варіантах з інокуляцією, так і в контрольних.

Вміст СР 46 % у сінажі з люцерни забезпечив утворення МКБ молочної кислоти на рівні від 3,31 % до 3,43 % у дослідних та контрольних варіантах. Відсоток молочної кислоти у сінажі з люцерни за вологості 37 % був нижчим та коливався у межах 1,23–1,96 %. Водночас вміст молочної кислоти у дослідних варіантах корму за вмісту СР 37 % перевищував контрольний на 22–59 %. Очевидно, за підвищеної вологості сінажу інтродуковані штами МКБ ефективніше використовують легкодоступні форми вуглеводів, як порівняти з епіфітними МКБ. Масляної кислоти у сінажі з люцерни в обох дослідях не виявлено. Отже, ефективність застосування МКБ для сінажування люцерни залежить як від штаму мікроорганізмів, так і від вологості субстрату та вмісту в ньому СР.

Висновки. Інтродукція досліджуваних штамів молочнокислих бактерій у високобілкову сінажну масу люцерни сприяла збільшенню чисельності МКБ на порядки проти контрольного варіанту, пригніченню розвитку клостридій, джіржджів та швидкому зниженню активної кислотності, що підтверджує інформацію щодо впливу інокулянтів на основі МКБ на ферментацію рослинної сировини шляхом корегування складу угруповань мікроорганізмів [29].



а) Дослід I, вміст СР 46 %



б) Дослід II, вміст СР 37 %

Рис. 5. Динаміка рН у процесі сінажування люцерни.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Tao L., Guo X. S., Zhon H., Undersander D. J., Nandety A. Short communication: Characteristics of proteolytic activities of endo- and exopeptidases in alfalfa herbage and their implications for proteolysis in silage. *Journal of Dairy Science*. 2012. Vol. 95, № 8. P. 4591–4595. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-5383>
2. Химия и биохимия бобовых растений / под ред. М. Н. Запрометова. Москва, 1986. 335 с.
3. Богданов Г. А., Привало О. Е. Сенаж и силос. М.: Колос, 1983. 319 с.
4. Мишустин Е. Н. Микробиологические процессы при созревании сенажа. Е. Н. Мишустин, Г. И. Переверзева. *Научные основы консервирования растительных кормов*. М., 1976. С. 6–20.

5. Whiter A. G., Kung L. Jr. The effect of dry or liquid application of *Lactobacillus plantarum* MTDI on the fermentation of alfalfa silage. *Journal of Dairy Science*. 2001. № 84(10). P. 2195–2202. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74666-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74666-8)
6. Ребиндер П. А. О формах связи воды с материалом в процессе сушки. *Сборник материалов Всесоюзного совещания по интенсивности процессов и улучшению качества материалов при сушке в основных отраслях промышленности и сельского хозяйства*. М., 1958. С. 14.
7. Pahlow G., Muck R. E., Driehuis F., Elfelink S. J. O., Spoelstra S. F. Microbiology of ensiling. *Silage science and technology*. 2003. № 42. P. 31–93. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr42.c2>
8. Muck R. E. Recent advances in silage microbiology. *Agric Food Sci*. 2013. № 22(1) С. 3–15.

<https://doi.org/10.23986/afsci.6718>

9. Driehuis F., Wilkinson J. M., Jiang Y., Ogunade I., Adesogan A. T. Silage review: animal and human health risks from silage. *Journal of Dairy Science*. 2018. № 101. С. 4093–4110. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13836>

10. Broberg A., Jacobsson K., Strom K., Schnurer J. Metabolite profiles of lactic acid bacteria in grass silage. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007. № 73. P. 5547–5552. <https://doi.org/10.1128/AEM.02939-06>

11. Fabiszewska A. U., Zielińska K. J., Wróbel B. Trends in designing microbial silage quality by biotechnological methods using lactic acid bacteria inoculants: a minireview. *World J Microbiol Biotechnol*. 2019. № 35. P. 76. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2649-2>

12. Guo X. S., Ke W. C., Ding W. R., Ding L. M., Xu D. M., Wang W. W. ... Yang F. Y. Profiling of metabolome and bacterial community dynamics in ensiled *Medicago sativa* inoculated without or with *Lactobacillus plantarum* or *Lactobacillus buchneri*. *Scientific Reports*. 2018. № 8. 357. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18348-0>

13. Hu Z., Niu H., Tong Q., Chang J., Yu J., Li S. ... Ma D. The microbiota dynamics of alfalfa silage during ensiling and after air exposure, and the metabolomics after air exposure are affected by *Lactobacillus casei* and cellulase addition. *Frontiers in Microbiology*. 2020. № 11. 519121. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.519121>

14. Yang F., Wang Y., Zhao S., Wang Y. *Lactobacillus plantarum* inoculants delay spoilage of high moisture alfalfa silages by regulating bacterial community composition. *Frontiers in Microbiology*. 2020. Vol. 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01989>

15. Brien M., O'Kiely P., Forristal P., Fuller H. Fungi isolated from contaminated baled grass silage on farms Irish Midlands. *FEMS Microbiol Lett*. 2005. Vol. 247, Is. 2. P. 131–135. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.04.037>

16. Bai J., Ding Z., Ke W., Xu D., Wang M., Huang W. ... Guo X. Different lactic acid bacteria and their combinations regulated the fermentation process of ensiled alfalfa: ensiling characteristics, dynamics of bacterial community and their functional shifts. *Microbial Biotechnology*. 2021. № 14. P. 1171–1182. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13785>

17. Van Egmond H. P. Natural toxins: risks, regulations and the analytical situation in Europe. *Anal Bioanal Chem*. 2004. Vol. 378, № 5. P. 1152–1160. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-003-2373-4>

18. Müller T., Ulrich A., Ott E. M., Müller M. Identification of plant-associated enterococci. *J Appl*

Microbiol. 2001. Vol. 91. P. 268–278. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01373.x>

19. O'Brien M., Nielsen K. F., O'Kiely P., Forristal P. D., Fuller H. T., Frisvad J. C. Mycotoxins and other secondary metabolites produced in vitro by *Penicillium paneum* Frisvad and *Penicillium roqueforti* Thom isolated from baled grass silage in Ireland. *J Agric Food Chem*. 2006. Vol. 54. P. 9268–9276. <https://doi.org/10.1021/jf0621018>

20. Pauly T. M., Rodhe I. Slurry application on ley-effect of method on the hygienic quality of grass silage. *Proceedings of the XIII International Silage Conference, Auchincruive, Scotland*. 2002. P. 410–411.

21. Queiroz O. C. M., Ogunade I. M., Weinberg Z., Adesogan A. T. Silage review: foodborne pathogens in silage and their mitigation by silage additives. *Journal of Dairy Science*. 2018. Vol. 101. P. 4132–4142. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13901>

22. McAllister T. A., Dunière L., Drouin P., Xu S., Wang Y., Munns K., Zaheer R. Silage review: Using molecular approaches to define the microbial ecology of silage. *J Dairy Sci*. 2018. Vol. 101. P. 4060–4074. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13704>

23. Штам бактерій *Lactobacillus plantarum* для виготовлення пробіотичних препаратів та мікробних консервантів для кормовирництва: пат. 115938 Україна. МПК С12N 1/20, А61К 35/744, Н. О. Кравченко, О. М. Дмитрук, В. О. Агеєв, 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.

24. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd ed. Vol. 2. The Proteobacteria / Eds. D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley. New York : Springer-Verlag, 2005. 1388 p.

25. Теппер Е. З., Шильникова В. К., Переверзева Г. И. Практикум по мікробіології. М. : Колос, 1979. 215.

26. Квасников Е. И. Молочнокислые бактерии и пути их использования. М. : Наука, 1975. 392 с.

27. Mann J. C., Rogosa M., Elisabeth Sharpe M. A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of applied bacteriology*. 1960. Vol. 23, Is. 1. P. 130–135. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>

28. Кравченко О. О. Зберігання та контроль якості кормів: методичні рекомендації. Миколаїв, 2017. 79 с.

29. Guo X., Xu D., Li F., Bai J., Su R. Current approaches on the roles of lactic acid bacteria in crop silage. *Microb Biotechnol*. 2023. 16(1). P. 67–87. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14184>

Отримано 17.08.2023

MICROBIOLOGICAL PROCESSES IN THE LUCERNE HAYLAGE UNDER INOCULATION WITH LACTIC ACID BACTERIA

N. O. Kravchenko, O. M. Dmytruk

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

Objective. To characterize the effect of lactic acid bacteria (LAB) on the quantitative and qualitative composition of the groups of microorganisms in the lucerne haylage after their introduction. **Methods.** Microbiological (cultivation of microorganisms on various media, determination of their viability, measurement of osmotolerance, determination of the amount of lactic acid during cultivation on skimmed sterile milk), microscopic, laboratory experiments on the lucerne haying with a dry matter (DM) content of 46 % and 37 % with and without inoculation with LAB strains, statistical. **Results.** Lucerne was inoculated with monocultures of *Lactobacillus* sp. LH42, *Lactobacillus* sp. LH43, *Lactobacillus* sp. LH47, *L. plantarum* KT-L18/1 osmotolerant strains, which showed tolerance to 2 %, 4 %, 6.5 % sodium chloride in 100 % of cases. The best indicators in terms of active and titrated acidity were found in cultures of *Lactobacillus* sp. LH47, *L. plantarum* KT-L18/1. The inoculation of LAB into the haylage ecosystem at Day 15 of fermentation resulted in an increase in the number of LAB compared to the untreated control. At Day 45 of lucerne haying, the number of LAB decreased and was registered at the level from 1 to 100 billion CFU/g at a 46 % DM content and at the level from 0.01 to 10 billion CFU/g at a 37 % DM content. The greatest development of clostridia in the lucerne haylage in experiments was reported at Day 3 with a sharp decrease in their number at Day 45. The influence of *Lactobacillus* sp. LH 43, *Lactobacillus* sp. LH 47, *L. plantarum* KT-L18/1 on the reduction of the growth of the number of clostridia both at a 46 % and 37 % DM content at the end of the fermentation period was shown. A higher number of yeasts was established at a lower (37 %) content of DM in the haylage. A fungistatic effect was established in variants with LAB inoculation versus the control variant. The relationship between the dynamics of decreasing active acidity (pH) and the dynamics of microbiota development has been shown. **Conclusion.** Inoculation of the studied strains of lactic acid bacteria into high-protein lucerne haylage mass contributed to an order of magnitude increase in the number of LAB versus the control variant, suppression of the development of clostridia, yeasts and a rapid decrease in active acidity, which confirms data about the effect of LAB-based inoculants on the fermentation of plant raw materials by adjusting the composition of groups of microorganisms

Key words: lactic acid bacteria, haylage, fermentation, clostridia, micromycetes.

REFERENCES

1. Tao, L., Guo, X. S., Zhon, H., Undersander, D. J., & Nandety, A. (2012). Short communication: Characteristics of proteolytic activities of endo- and exopeptidases in alfalfa herbage and their implications for proteolysis in silage. *Journal of Dairy Science*, 95(8), 4591–4595. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-5383>
2. Zaprometova, M. N. (Ed.). (1986). *Khimiya i biokhimiya bobovykh rasteniy* [Chemistry and biochemistry of leguminous plants]. Moskva [in Russian].
3. Bohdanov, H. A., & Pryvalo, O. E. (1983). *Senazh y sylos* [Haylage and silage]. Moskva [in Russian].
4. Myshustyn, E. N. (1976). Mikrobiologicheskie protsessy pri sozrevanii senazha [Microbiological processes during haylage maturation]. In E. H. Mishustin, G. I. Pereverzeva (Eds.). *Nauchnye osnovy konservirovaniya rastitel'nykh kormov* [Scientific Foundations of Plant Feed Preservation]. (pp. 6–20). Moskva [in Russian].
5. Whiter, A. G., & Kung, L. Jr. (2001). The effect of dry or liquid application of *Lactobacillus plantarum* MTDI on the fermentation of alfalfa silage. *Journal of Dairy Science*, 84(10), 2195–2202. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74666-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74666-8)
6. Rebynder, P. A. (1958). O formakh svyazi vody s materialom v protsesse sushki [On the forms of connection between water and material in the process of drying]. *Sbornyk materyalov Vsesoiuznogo soveshchaniya po yntensyvnosti protsessov y uluchshenyiu kachestva materyalov pry sushke v osnovnykh*

otrasliakh promyshlennosti y selskoho khoziaistva. Moskva [in Russian].

7. Pahlow, G., Muck, R. E., Driehuis, F., Elferink, S. J. O., & Spoelstra, S. F. (2003). Microbiology of ensiling. *Silage science and technology*, 42, 31–93. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr42.c2>

8. Muck, R. E. (2013). Recent advances in silage microbiology. *Agric Food Sci*, 22(1), 3–15. <https://doi.org/10.23986/afsci.6718>

9. Driehuis, F., Wilkinson, J. M., Jiang, Y., Ogunade, I., & Adesogan, A. T. (2018). Silage review: animal and human health risks from silage. *Journal of Dairy Science*, 101, 4093–4110. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13836>

10. Broberg, A., Jacobsson, K., Strom, K., & Schnurer, J. (2007). Metabolite profiles of lactic acid bacteria in grass silage. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 5547–5552. <https://doi.org/10.1128/AEM.02939-06>

11. Fabiszewska, A. U., Zielińska, K. J. & Wróbel, B. (2019). Trends in designing microbial silage quality by biotechnological methods using lactic acid bacteria inoculants: a minireview. *World J Microbiol Biotechnol*, 35, 76. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2649-2>

12. Guo, X. S., Ke, W. C., Ding, W. R., Ding, L. M., Xu, D. M., Wang, W. W. ... Yang, F. Y. (2018). Profiling of metabolome and bacterial community dynamics in ensiled *Medicago sativa* inoculated without or with *Lactobacillus plantarum* or *Lactobacillus buchneri*. *Scientific Reports*, 8, 357. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18348-0>

13. Hu, Z., Niu, H., Tong, Q., Chang, J., Yu, J., Li, S. ... Ma, D. (2020). The microbiota dynamics of alfalfa silage during ensiling and after air exposure, and the metabolomics after air exposure are affected by *Lactobacillus casei* and cellulase addition. *Frontiers in Microbiology*, 11, 519121. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.519121>

14. Yang, F., Wang, Y., Zhao, S., & Wang, Y. (2020). *Lactobacillus plantarum* inoculants delay spoilage of high moisture alfalfa silages by regulating bacterial community composition. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01989>

15. O'Brien, M., O'Kiely, P., Forristal, P., & Fuller, H. (2005). Fungi isolated from contaminated baled grass silage on farms Irish Midlands. *FEMS Microbiol Lett*, 247(2), 131–135. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.04.037>

16. Bai, J., Ding, Z., Ke, W., Xu, D., Wang, M., Huang, W. ... Guo, X. (2021). Different lactic acid bacteria and their combinations regulated the fermentation process of ensiled alfalfa: ensiling characteristics, dynamics of bacterial community and their functional shifts. *Microbial Biotechnology*, 14, 1171–1182. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13785>

17. Van Egmond, H. P. (2004). Natural toxins: risks, regulations and the analytical situation in Europe. *Anal Bioanal Chem*, 378(5), 1152–1160. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-003-2373-4>

18. Müller, T., Ulrich, A., Ott, E. M., & Müller, M. (2001). Identification of plant-associated enterococci. *J Appl Microbiol*, 91, 268–278. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01373.x>

19. O'Brien, M., Nielsen, K. F., O'Kiely, P., Forristal, P. D., Fuller, H. T., & Frisvad, J. C. (2006). Mycotoxins and other secondary metabolites produced in vitro by *Penicillium paneum* Frisvad and *Penicillium roqueforti* Thom isolated from baled grass silage in Ireland. *J Agric Food Chem*, 54, 9268–9276. <https://doi.org/10.1021/jf0621018>

20. Pauly, T. M., & Rodhe, I. (2002). Slurry application on ley-effect of method on the hygienic quality of grass silage. Proceedings of the XIII International Silage Conference (pp. 410–411), Auchincruive, Scotland.

21. Queiroz, O. C. M., Ogunade, I. M., Weinberg, Z., & Adesogan, A. T. (2018). Silage review: foodborne pathogens in silage and their mitigation by silage additives. *Journal of Dairy Science*, 101, 4132–4142. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13901>

22. McAllister, T. A., Dunière, L., Drouin, P., Xu, S., Wang, Y., Munns, K., & Zaheer, R. (2018). *J Dairy Sci*, 101, 4060–4074 <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13704>

23. Pat. 115938 UA, MPK S12N 1/20, A61K 35/744. Strain of bacteria *Lactobacillus plantarum* for the manufacture of probiotic preparations and microbial preservatives for feed production, Kravchenko, N. O., Dmytruk, O. M., Aheiev, V. O., Bozhok, L. V. Publ. 10.01.2018.

24. Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T. (Eds.). (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2. The Proteobacteria. New York: Springer-Verlag.

25. Tepper, E. Z., Shylnykova, V. K., & Pereverzeva, H. Y. (1979). *Praktykum po mykrobiolohy* [Microbiology workshop]. Moskva [in Russian].

26. Kvasnykov, E. Y. (1975). *Molochnokyslye bakteryy y puty ykh yspolzovaniya* [Lactic Acid Bacteria and Ways to Use Them]. Moskva [in Russian].

27. Mann, J. C., Rogosa, M., & Elisabeth Sharpe, M. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of applied bacteriology*, 23(1), 130–135. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>

28. Kravchenko, O. O. (2017). *Zberihannia ta kontrol yakosti kormiv* [Storage and quality control of feed]. Mykolaiv [in Ukrainian].

29. Guo, X., Xu, D., Li, F., Bai, J., & Su, R. (2023). Current approaches on the roles of lactic acid bacteria in crop silage. *Microb Biotechnol*, 16(1), 67–87. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14184>

Received 17.08.2023