

УДК 579.64.636.085.7

**МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ ПРЕПАРАТ НА ОСНОВЕ
ГОМОФЕРМЕНТАТИВНЫХ ШТАММОВ *Lactobacillus plantarum*,
ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПРИРОДНЫХ ИСТОЧНИКОВ
ДЛЯ БИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ РЕСУРСОВ
(обзор проведенных исследований в период с 2000 по 2015 г.)**

Р.А. Шурхно

*Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства,
г. Казань, 420059, Россия*

Аннотация

Статья представляет собой обзор исследований, проведенных автором по совершенствованию процесса биоконсервирования растительных ресурсов путем создания эффективного микробиологического препарата на основе активных штаммов молочнокислых бактерий. Известно, что решение проблемы производства биологических консервантов связано с использованием основополагающих принципов микробиологических, биотехнологических процессов, которые способствуют созданию биологических консервантов, обеспечивающих наиболее оптимальную и эффективную ферментацию растительных масс, – это использование гомоферментативных молочнокислых бактерий *Lactobacillus plantarum*, выделенных из природных экологических ниш; консервирование растительной массы молочнокислой культурой в стадии высокой физиологической активности. С учетом приведенных особенностей разработан и внедрен в промышленное производство микробиологический препарат «Универсальная силосная закваска – БИОАГРО» на основе двух новых штаммов *L. plantarum* RS3 и *L. plantarum* RS4, выделенных из природных источников. Промышленное внедрение и испытание созданного микробиологического препарата осуществляли в течение трех лет (2012–2014 гг.) в десяти хозяйствах восьми районах Республики Татарстан. Установлено, что применение препарата в сочетании с оптимизированной технологией биоконсервирования высокобелковых многолетних, однолетних злаковых трав, их смесей и кукурузы, и слабопроявленного растительного сырья в анаэробных условиях повышает качественные характеристики силоса и сенажа, а также увеличивает их энергетическую ценность и улучшает экономические показатели технологических процессов заготовки кормов.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, эпифитная микрофлора, идентификация, биоконсервирование, растительная масса, органические кислоты, активная кислотность, биологический консервант

Традиционная, классическая биотехнология основывается на методах и технологиях производства различных продуктов с использованием природных биологических объектов и процессов. В настоящее время актуальным и востребованным направлением в сельском хозяйстве является биотехнология кормопроизводства.

От уровня научно-технического прогресса в кормопроизводстве во многом зависит развитие АПК и обеспечение продовольственной безопасности страны.

В связи с этим чрезвычайно актуальным является развитие и совершенствование биотехнологии получения безопасных и сбалансированных кормов с использованием микробиологических препаратов на основе молочнокислых бактерий.

Одно из перспективных направлений по изучению интенсификации биоконсервирования и повышения качества кормов основано на применении индивидуальных штаммов или ассоциаций молочнокислых бактерий. В России разработаны и предложены для ферментации свыше двадцати различных бактериальных препаратов, однако практика их применения не всегда гарантирует получение доброкачественного продукта [1, 2].

Известно, что решение проблемы промышленного производства биологических консервантов для ферментации различных кормовых культур связано с поиском, подбором, селекцией и анализом эффективных штаммов молочнокислых бактерий [3–10]. Для процесса консервирования высокобелковых бобовых растений необходимы стартовые культуры молочнокислых бактерий, которые должны быть тщательно подобраны по определенным биотехнологическим признакам, таким как скорость роста и ацидогенеза, образование органических кислот, гомоферментативность, осмоотолерантность, умеренная протеолитическая активность, антагонистический эффект, доминирование над сопутствующей микрофлорой сбраживаемой растительной массы, органолептические качества получаемого продукта и его аэробная стабильность [11–15].

Учитывая указанные биотехнологические свойства лактобактерий, следует обратить внимание на молочнокислую микрофлору из естественных экологических ниш (филоферы, растительного сока, ризосферы и др.). Во всех эколого-географических районах среди представителей микрофлоры, расположенной на поверхности растений, молочнокислые бактерии являются редкими, и их становление и развитие связаны с фазами вегетации растительного организма [16, 17]. Логично предположить, что местная молочнокислая микрофлора из таких источников наиболее приспособлена к природно-климатическим условиям региона и отличается стабильностью проявляемых свойств. В связи с этим очевидно, что поиск штаммов молочнокислых бактерий с заданными свойствами будет более успешным в надземной части растений. Возможно предположение, что такого характера штаммы молочнокислых бактерий могут быть положены в основу создания универсального микробиологического препарата, обеспечивающего оптимальный режим биоконсервирования высокобелковых культур для получения качественного и сбалансированного растительного корма [18, 19].

Целью проведенных исследований явилось совершенствование процесса биоконсервирования растительных ресурсов путем создания эффективного микробиологического препарата на основе активных штаммов молочнокислых бактерий, выделенных из различных природных источников.

Работа проводилась в период с 2000 по 2015 г. в Татарском научно-исследовательском институте сельского хозяйства (г. Казань) в рамках Программы фундаментальных и приоритетных прикладных исследований по научному обеспечению развития агропромышленного комплекса Российской Федерации.

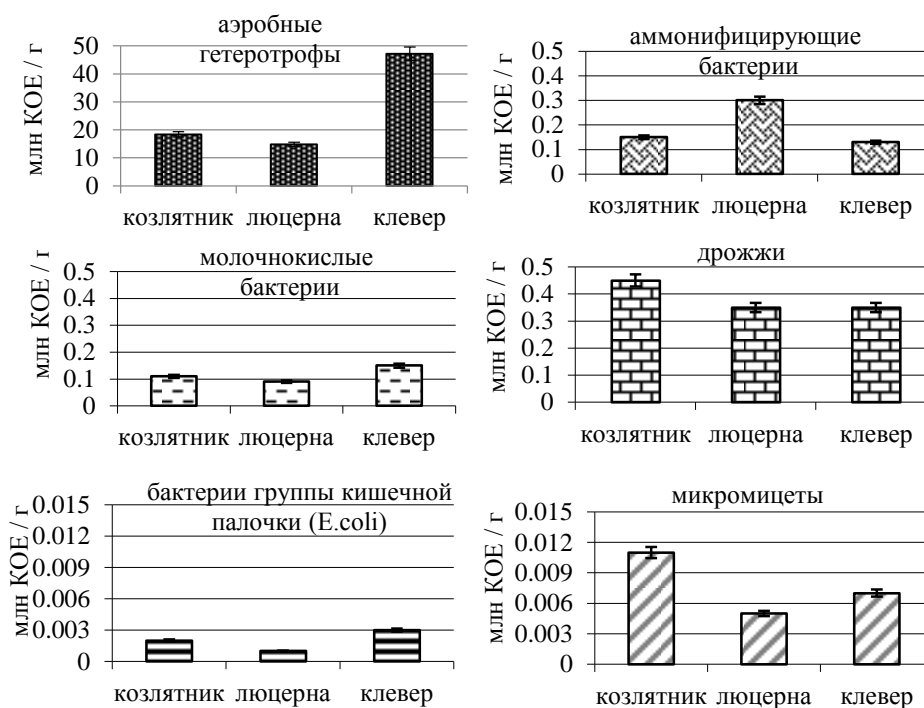


Рис. 1. Численность физиологических групп микроорганизмов в филосфере многолетних бобовых трав

В работе использовались экспериментальные штаммы молочнокислых бактерий, выделенные из различных экологических ниш, и бобовые культуры: клевер луговой (сорт Ранний-2), козлятник восточный (сорт Гале), люцерна изменчивая (сорт Айслу).

В процессе работы исследовались соотношения различных физиологических групп эпифитной микрофлоры в фазе бутонизации растений и в момент их скашивания для консервирования (рис. 1).

Как показал анализ, эпифитная микрофлора козлятника, клевера и люцерны в фазе бутонизации включала небольшое количество лактобактерий (от $90 \cdot 10^3$ до $150 \cdot 10^3$ КОЕ/г). Численность аммонифицирующих бактерий была больше соответственно в 1.4 и 2 раза, чем молочнокислых. Количество дрожжей изменялось в диапазоне от $350 \cdot 10^3$ до $450 \cdot 10^3$ КОЕ/г. Показатели численности микромицетов и бактерий группы кишечной палочки изменялись в пределах от $5.0 \cdot 10^3$ до $11.0 \cdot 10^3$ КОЕ/г и от $1.0 \cdot 10^3$ до $3.0 \cdot 10^3$ КОЕ/г соответственно. Аэробные гетеротрофные микроорганизмы оказались доминирующей группой, их количество варьировало в пределах от $148 \cdot 10^5$ до $475 \cdot 10^5$ КОЕ/г. Молочнокислые бактерии не являлись доминирующими в составе филосферы исследуемых бобовых культур (рис. 1)¹.

Отмеченные среди эпифитной микрофлоры бактерии группы кишечной палочки и микромицеты оказались нетипичными микроорганизмами в исследуемой фазе развития бобовых растений. Установлено, что состав микроорганизмов,

¹ Статистическую обработку данных проводили с использованием программ электронных таблиц, на графиках представлены среднее \pm стандартное отклонение.

обитающих на надземных частях растений, определялся специфическими условиями среды обитания и носил отпечаток влияния обсеменности их почвенной микрофлорой. Вероятно, поэтому там наряду с типичными представителями филосферной микрофлоры отмечены и формы почвенных микроорганизмов.

Исследована динамика численности различных микроорганизмов в прикорневой зоне изучаемых многолетних бобовых культур (см. рис. 2). В указанных экологических нишах выделены представители аэробных гетеротрофов, споровых микроорганизмов, актиномицетов, микромицетов, дрожжей, а также молочнокислых бактерий. В процессе анализа материала выяснилось, что концентрация всех физиологических групп микроорганизмов, за исключением актиномицетов, была выше во все периоды вегетации по сравнению с контрольным вариантом (почва без растений). Как показали наблюдения, в целом концентрация молочнокислых бактерий ризосферной почвы бобовых культур была невысокой и составляла $2.0 \cdot 10^3 - 9.0 \cdot 10^3$ КОЕ/г почвы. Величина численности лактобактерий прикорневой почвы на 2–4 порядка была меньше концентрации аэробных гетеротрофов. Максимальная численность молочнокислых бактерий в ризосфере люцерны и клевера наблюдалась в июне ($9.0 \cdot 10^3$ и $5.0 \cdot 10^3$ КОЕ/г почвы соответственно), а у козлятника – в июле месяце ($4.0 \cdot 10^3$ КОЕ/г почвы). В то же время количество ризосферных молочнокислых бактерий было на один порядок выше относительно контрольного варианта. Приведенные обстоятельства, вероятно, указывают на то, что условия обитания для молочнокислых бактерий в ризосфере многолетних трав оказались более оптимальными по сравнению с почвой, где растения отсутствовали (рис. 2).

Проведение микробиологических исследований ризосферы многолетних бобовых трав было связано с необходимостью повышения урожайности высокобелковых кормовых культур (основного объекта ферментации) при одновременном сохранении органического вещества почвы. В период с 2004 по 2006 г. были изучены ризосферные сообщества козлятника и люцерны 1-го и 3-го года пользования, а клевера 1-го и 2-го года пользования. В ходе исследований оценены реальные масштабы численности, а также сезонная и годовая динамика структуры комплекса почвенных микроорганизмов в ризосфере многолетних бобовых трав.

Показано доминирование бактериального комплекса, представленного в основном псевдомонадами и бациллами. Установлена осенняя и весенняя сукцессия между микромицетами и актиномицетами в ризосферной почве изучаемых культур. Выявлено, что при оценке почвенного плодородия перспективно использовать биологические показатели, отражающие деятельность почвенных микроорганизмов, ассоциированных с растениями при сельскохозяйственном использовании почв в конкретной географической зоне. Полученные результаты эксперимента свидетельствуют об увеличении в почве ассоциативного и симбиотического азота, что подтверждается содержанием гумуса и доступного азота, и в целом наблюдается положительный баланс подвижных форм калия и фосфора, что делает ценным культивирование многолетних бобовых культур как предшественников, так и в качестве ценных кормовых культур в биологическом земледелии [20–24].

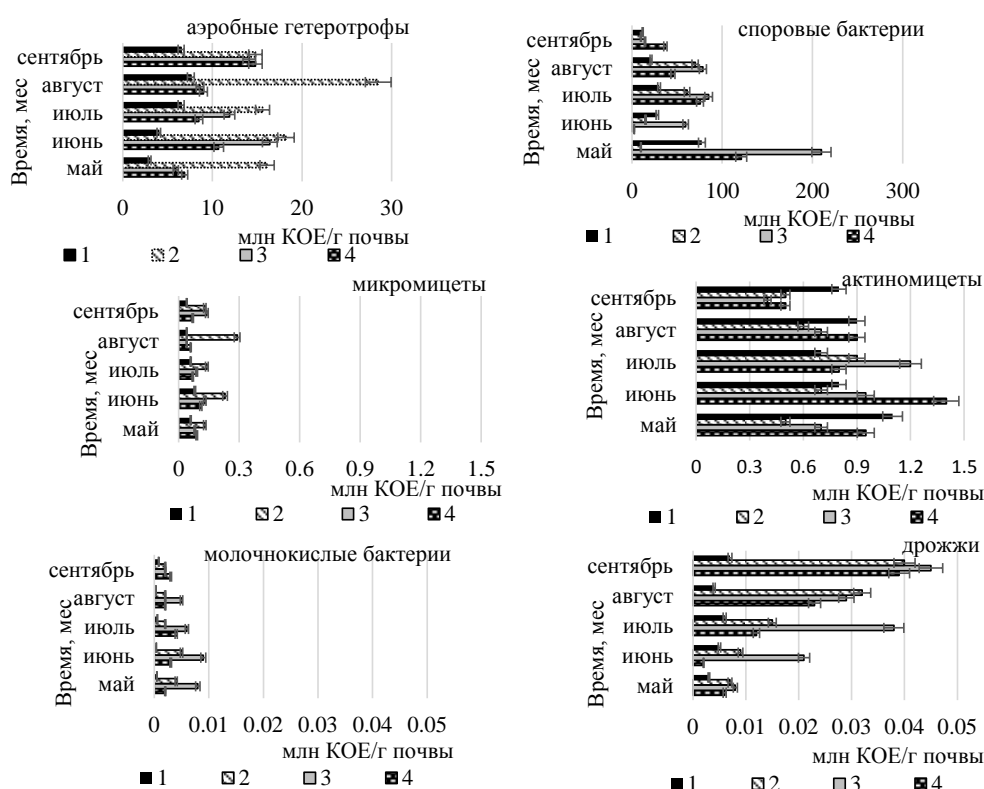


Рис. 2. Динамика численности микроорганизмов в ризосфере бобовых трав. Обозначения: 1 – контрольный вариант, 2 – клевер, 3 – люцерна, 4 – козлятник

Бобовые культуры обладают высокой кормовой ценностью, поэтому поиск технологий сохранности питательных веществ этих культур и качества получаемого корма после консервирования представляет собой чрезвычайно актуальную задачу.

В своих исследованиях по выделению молочнокислых бактерий с заданными свойствами мы придерживались основополагающих принципов микробиологических, биотехнологических процессов, которые способствуют созданию биологических консервантов, обеспечивающих наиболее оптимальную и эффективную ферментацию растительных масс. Это использование гомоферментативных молочнокислых бактерий *Lactobacillus plantarum*, выделенных из природных экологических ниш; консервирование растительной массы молочнокислой культурой в стадии высокой физиологической активности [10]. В соответствии с целью указанной работы проведен направленный скрининг, охватывающий фило- и ризосферу бобовых культур, силоса и растительные соки более 40 изолятов, что позволило получить 15 изолятов бактерий с характерными биотехнологическими свойствами молочнокислого брожения. В последующем с учетом гомоферментативного типа брожения и скорости ацидогенеза отобрано семь штаммов молочнокислых бактерий, способных к расщеплению углеводов до молочной кислоты в количестве от 11.1 до 18.3 мг в 1 мл субстрата. Дальнейшую идентификацию семи изолятов осуществляли по классификации микроорганизмов Берги. По совокупности дифференциально-диагностических тестов,

таких как морфологические, культуральные, сбраживание сахаров, биохимические, установили принадлежность изолятов к систематической группе – к семейству Lactobacillaceae, роду *Lactobacillus* [18].

Для оценки биотехнологических свойств штаммов молочнокислых бактерий важное значение имеет определение их осмоотолерантности и протеолитической активности. Как показал анализ полученных данных, большая часть выделенных природных штаммов молочнокислых бактерий по показателям осмоотолерантности (высокие концентрации глюкозы и хлорида натрия) обладала повышенной устойчивостью [18]. В целом для всех штаммов протеолитическая активность в слабокислой среде по гемоглобину в конце стационарной фазы отличалась низкими значениями по сравнению с ее показателями в нейтральной зоне рН-действия по казеину. Процесс консервирования растительного сырья происходит в кислой среде, определение потенциальной протеолитической активности выделенных природных штаммов молочнокислых бактерий из экологических ниш показал достаточно низкую их активность, что согласуется с биотехнологическими требованиями при подборе оптимальных штаммов для создания биологических консервантов.

Таким образом, из филосферы культивируемых сортов многолетних бобовых трав и растительных соков в селективных условиях выделены молочнокислые бактерии из рода *Lactobacillus*, обладающие повышенной способностью к продукции молочной кислоты и скоростью кислотообразования, низкой протеолитической активностью и устойчивостью к повышенному осмотическому напряжению среды [18].

На основании этих признаков четыре штамма молочнокислых бактерий депонированы во Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН под номерами: ВКМ В-2341 Д – *Lactobacillus* sp. RS2, ВКМ В-2342 Д – *Lactobacillus* sp. RS3, ВКМ В-2343 Д – *Lactobacillus* sp. RS4, ВКМ В-2344 Д – *Lactobacillus* sp. RS7.

Известно, что идентификация молочнокислых бактерий только на основании морфологических, культуральных и физиолого-биохимических признаков является недостаточной, поскольку под воздействием различных факторов многие виды приобретают высокий уровень фенотипической изменчивости. Поэтому у четырех изучаемых штаммов молочнокислых бактерий осуществлено генотипирование и определены нуклеотидные последовательности фрагмента гена *16S рPHK* длиной 1437 п.н. Проведенный анализ показал, что все четыре идентифицируемых штамма молочнокислых бактерий располагались в одном кластере с референтными штаммами, относящимися к видам *Lactobacillus plantarum*, *L. paraplantarum* и *L. pentosus*.

Согласно литературным данным [25], различие в нуклеотидных последовательностях генов *16S рPHK* данных видов составляет менее 1%, что не позволяет определить окончательную видовую идентификацию по данному молекулярному признаку. В связи с этим был проведен молекулярно-генетический анализ нуклеотидной последовательности фрагмента гена *pheS* размером 454 п.н. В ходе филогенетического анализа была выявлена локализация всех четырех идентифицируемых лактобацилл в одном кластере с референтными штаммами, относящихся к видам *Lactobacillus plantarum*. Примененный подход позволил

достоверно вычленили идентифицируемые штаммы от видов *Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus pentosus*. В связи с этим штаммы *Lactobacillus* sp. RS3, *Lactobacillus* sp. RS4, *Lactobacillus* sp. RS6 и *Lactobacillus* sp. RS7 были отнесены к виду *Lactobacillus plantarum* [26].

Анализ масс-спектра рибосомных белков (MALDI-TOF MS) природных штаммов молочнокислых бактерий свидетельствовал также о принадлежности их к виду *Lactobacillus plantarum* [26].

Нуклеотидные последовательности данных штаммов внесены в базу данных GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information, США) под следующими номерами: *L. plantarum* RS3 – KR779536 и 779532, *L. plantarum* RS4 – KR779537 и KR779533, *L. plantarum* RS6 – KR779538 и KR779534, *L. plantarum* RS7 – KR779539 и KR779535.

С целью сравнительной оценки эффективности предварительно селективированных штаммов молочнокислых бактерий как потенциальных компонентов стартовых культур впервые осуществлялось моделирование молочнокислого сбраживания соков бобовых растений (клевера, козлятника, люцерны). На разработанную и практически реализованную модельную систему ферментации растительных соков бобовых культур в 2007 г. оформлен патент РФ (№ 2309605 «Способ диагностики силосуемости растений») [27, 28]. Для установления наиболее перспективных монокультур из выделенных штаммов молочнокислых бактерий был проведен микробиологический мониторинг молочнокислого сбраживания соков в течение 45 сут (табл. 1).

Максимальная численность молочнокислых бактерий наблюдалась на третьи и десятые сутки сбраживания соков, что является определяющим моментом для качественного биоконсервирования зеленой массы.

В процессе исследования определялись актуальная кислотность среды; состав и количество органических кислот и содержание витаминов А и Е. Для свежих растительных соков значения рН были одинаковыми и находились в пределах 6.1 и 6.2. По истечении 45 сут среда в растительном соке козлятника и клевера была кислой, тогда как в варианте с люцерной она оказалась щелочной. Полученные результаты по содержанию органических кислот в сбраживаемых субстратах указывают на то, что при ферментации сока из козлятника наибольшее количество молочной кислоты выявлено в вариантах со штаммами *L. plantarum* RS3, *L. plantarum* RS4 и *L. plantarum* BS933. При консервировании сока из клевера максимальные концентрации молочной кислоты отмечены в вариантах с интродукцией штаммов *L. plantarum* RS3, *L. plantarum* BS933 и *L. plantarum* RS4 [27].

В модельном опыте с соком люцерны данные отражают прямую зависимость между реакцией среды (слабощелочной) и количеством органических кислот. В проводимом эксперименте после 45 сут отмечено увеличение витамина А при ферментации сока козлятника в варианте со штаммом *L. plantarum* RS3 – в 4.8 раза; при консервации сока клевера с лактобациллами *L. plantarum* RS3 – в 4 раза, *L. plantarum* RS4 – в 3.7 раза и *L. plantarum* RS6 – в 5.5 раза. Аналогичную тенденцию наблюдали с витамином Е, кроме варианта со штаммом *L. plantarum* RS6, где концентрация витамина снизилась по окончании процесса брожения (у козлятника). Результаты исследований по моделированию молочнокислого

Табл. 1

Изменение численности молочнокислых бактерий в процессе ферментации растительных соков, инокулированных индивидуальными штаммами лактобацилл и лактококка

Время, сут	Штаммы молочнокислых бактерий, $\times 10^6$ КОЕ/мл								
	<i>L. sp.</i> RS1	<i>L. sp.</i> RS2	<i>L. pl.</i> RS3	<i>L. pl.</i> RS4	<i>L. sp.</i> RS5	<i>L. pl.</i> RS6	<i>L. pl.</i> RS7	<i>L. pl.</i> BS933	<i>S. f.</i> 500
Сок козлятника									
0	1.1	1.0	1.1	1.1	1.1	1.0	1.0	1.0	1.1
3	76	81.1	96.8	131	130	128	130	97	81
10	191	153	165	174	198	180	163	180	112
20	44	76.7	86	81	73.2	75	38	76	36
30	12.4	13.8	37.6	38	21	34	18.5	28.5	12
45	4	4.8	5.2	3.7	4.1	5.1	1.1	4.3	1.3
Сок клевера									
0	1.1	1.0	1.1	1.1	1.1	1.0	1.0	1.0	1.1
3	126	120	156	104	112	108	116	148	96
10	195	165	240	190	188	165	186	225	120
20	72	68	108	93	113	108	100	86.8	20
30	35	23.2	47	33.5	41.6	46	36	38.5	5.7
45	2	3.1	4.8	4.5	6.9	2.5	0.5	4.6	2.2
Сок люцерны									
0	1.1	1.0	1.1	1.1	1.1	1.0	1.0	1.0	1.1
3	73	106	98	102	101	123	135	86	116
10	105	175	145	155	178	196	220	120	158
20	32	64	58	53	69	68	96	57	34
30	11.6	26.9	19	18.5	22	19	41	20.1	4.1
45	0.6	1.9	1.6	1.9	2.5	3.7	5.1	3.1	0.9

Среднеквадратичное отклонение результатов трех повторностей $\sigma \leq 12\%$.

Сокращения: *L. sp.* – *Lactobacillus sp.*; *L. pl.* – *Lactobacillus plantarum*; *S.f.* 500 – *Streptococcus faecium* 500.

брожения на соках козлятника и клевера указывают на эффективную ферментацию растительного субстрата и высокую физиологическую активность природных штаммов. Однако данные по сбраживанию сока люцерны, указывающие на незначительные содержания органических кислот и повышенные показатели рН, свидетельствуют о невозможности консервации такого высокобелкового растения с низким содержанием сахаров в фазе бутонизации путем интродукции активных штаммов, но в дальнейшем эксперименты по силосованию люцерны в фазе цветения и в подвяленном виде показали положительные результаты [27].

Известно, что консервирование сопровождается деятельностью дрожжей, которые могут оказывать негативное влияние на качество силосуемых растительных масс. В связи с этим на основе растительных соков при совместном культивировании с монокультурами молочнокислых бактерий в течение 45 сут была определена их антагонистическая активность к тест-культуре *Candida scotti* (27 вариантов). Выяснилось, что негативному влиянию при ферментации способны противостоять только определенные штаммы молочнокислых бактерий, выделенные из филосферы люцерны (*L. plantarum* RS3), из растительного сока клевера (*L. plantarum* RS6) и сока люцерны (*L. plantarum* RS7) (рис. 3). Следует обратить внимание на то, что перечисленные штаммы молочнокислых

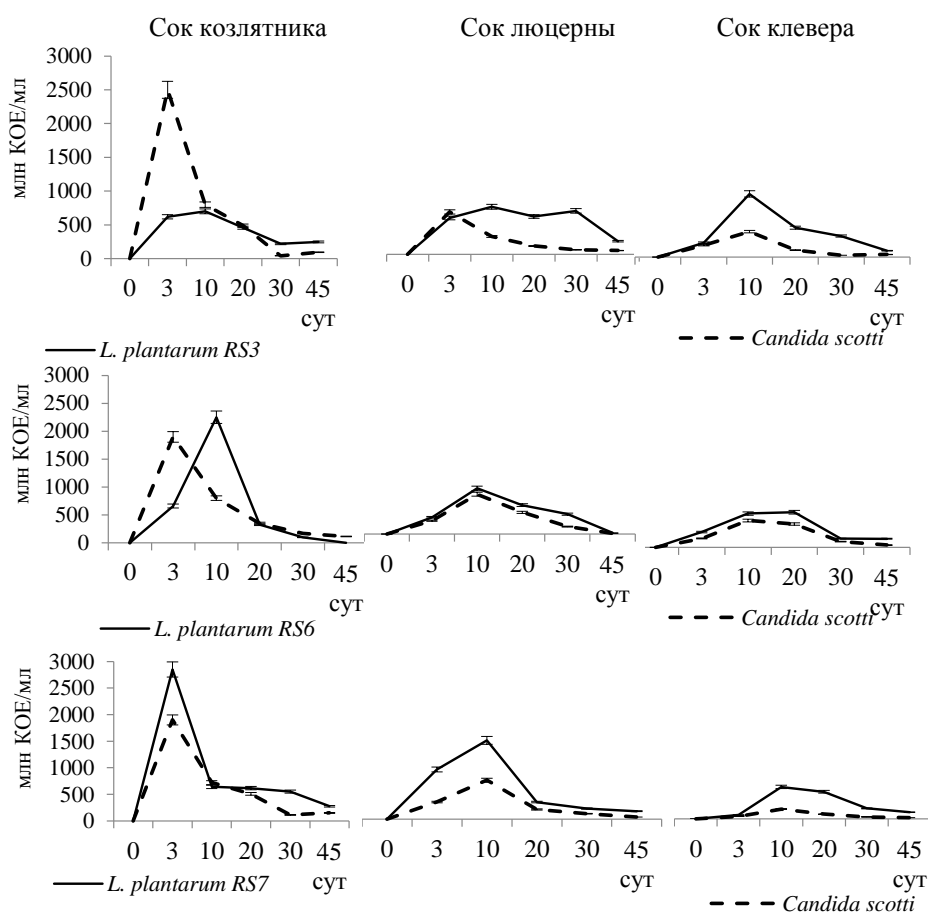


Рис. 3. Изменение численности молочнокислых бактерий с дрожжевой культурой в процессе ферментации растительных соков

бактерий изолированы с надземной части бобовых многолетних трав, которая характеризуется переменчивыми абиотическими факторами среды. Кроме того, их численность была хоть и невысокой, но стабильной, без резких перепадов на протяжении всего времени сбраживания соков и максимумы численности наблюдались на третьи и десятые сутки, которые сопровождались низкими значениями рН и относительно высоким содержанием молочной кислоты по сравнению с другими вариантами опыта [29].

Проведенные сравнительные исследования показали, что при оценке биотехнологических свойств молочнокислых бактерий с использованием только численности (титра) и без учета других показателей (концентрации молочной кислоты, рН среды, физиологического состояния бактериальной клетки и др.) не всегда можно получить достоверные и исчерпывающие характеристики применяемых штаммов. Часто и при высоком титре молочнокислых бактерий в биологическом консерванте могут быть получены некачественные корма при ферментации растительного сырья. Очевидно, концентрация лактобактерий не может быть использована в качестве интегрального и окончательного показателя при подборе и применении молочнокислых бактерий для ферментации растительных

масс. Необходимо проведение комплексной оценки используемых стартовых культур лактобактерий с определением количества лактата, активной кислотности среды и антагонистического эффекта.

Одним из основных этапов наших исследований являлось опытное консервирование [18], где в качестве испытуемых бобовых растений были выбраны клевер и козлятник с интродукцией четырех штаммов молочнокислых бактерий. Из выделенных природных лактобацилл использовали два штамма: *L. plantarum* RS3 и *L. plantarum* RS4, отобранные по скорости кислотообразования с особенностями проявления осмотолерантности и протеолитической активности. Коллекционный штамм *L. plantarum* BS933 и коммерческий штамм *Streptococcus faecium* 500 взяты для сравнения как рекомендованные для консервирования зеленой массы. С целью оценки эффективности исследуемых штаммов молочнокислых бактерий в процессе ферментации использовали для интродукции в растительную массу маркированные по рифампицину молочнокислые бактерии. Проведенная ферментация растительной массы клевера и козлятника показала, что консервирующий эффект оказался более выраженным при участии природных штаммов *L. plantarum* RS3 Rif^R и *L. plantarum* RS4 Rif^R. Данные штаммы лактобацилл в процессе биоконсервирования в значительной степени способствовали росту и развитию спонтанной молочнокислой микрофлоры, обладали активной деятельностью по сдерживанию роста и развития сопутствующей микрофлоры (аэробные гетеротрофы, аммонификаторы и дрожжи) и обеспечивали повышенное содержание молочной кислоты в сброживаемом субстрате. Как показал анализ, конкурентоспособность интродуцированных бактерий *L. plantarum* на фоне спонтанной молочнокислой микрофлоры свидетельствовала, что количественная динамика в силосуемой массе в период их активного роста на третьи и десятые сутки составляла от 40% до 64% от общей суммы молочнокислых бактерий. В готовом ферментированном продукте (силосе) же эта величина достигала 95.2% (для клевера) и 57% (для козлятника), что указывает на радикальное изменение популяционной структуры молочнокислых бактерий в готовом корме. Менее успешным по сравнению с приведенными лактобациллами проходило силосование растительной массы клевера и козлятника с применением реперного штамма *L. plantarum* BS933 Rif^R. У данного штамма, изолированного из кукурузного силоса, фактор оптимизации деятельности спонтанной молочнокислой микрофлоры выражен крайне слабо, повышение содержания молочной кислоты в корме, как правило, сопровождалось следовым присутствием масляной кислоты. Непригодным для консервирования растительных масс клевера и козлятника оказался коммерческий штамм *Streptococcus faecium* 500 Rif^R. Рассматриваемый штамм лактококка в процессе консервирования обладал слабой реакцией по ингибированию сопутствующей микрофлоры и в то же время сдерживал физиологическое развитие и рост спонтанных молочнокислых бактерий. Ферментация растительной массы с его участием проходила с концентрацией молочной кислоты на уровне значения контроля и с большим количеством пропионовой и масляной кислот. В результате проведенных исследований выяснилось, что силосование высокобелковых бобовых трав с использованием природных гомоферментативных штаммов молочнокислых бактерий *L. plantarum* RS3 и *L. plantarum* RS 4 осуществляется

с активизацией процесса биологического консервирования по ряду известных ключевых критериев: скорости ацидогенеза и соотношение молочной кислоты и гомологов жирных кислот. О положительном значении направленной инокуляции с применением приведенных штаммов свидетельствует и оценка органолептических свойств полученных кормов. В опытных вариантах со штаммами *L. plantarum* RS3 Rif^R и *L. plantarum* RS4 Rif^R высокое качество корма подтверждалось его светло-зелёным (оливковым) цветом, приятным силосным (травяным) запахом и хорошей структурой. С инокуляцией масс клевера и козлятника штаммом *Streptococcus faecium* 500 Rif^R отмечено потемнение корма и наличие запаха прогорклого масла [18].

Таким образом, необходимо подчеркнуть, что анализ результатов исследований ферментации растительных масс козлятника и клевера с применением четырех штаммов молочнокислых бактерий позволил отдать предпочтение двум природным штаммам *L. plantarum* RS3 и *L. plantarum* RS4, выделенных из филосферы люцерны и клевера.

Известно, что бобовые культуры обладают высокой кормовой ценностью, поэтому поиск биотехнологий по сохранности питательных веществ в полученном корме в результате консервирования является первостепенной проблемой. Для обеспечения совершенствования процесса биоконсервирования продолжался подбор из выделенных природных штаммов наиболее оптимальных лактобацилл для создания биологического консерванта с универсальными свойствами.

Для этих целей была заложена серия производственных опытов по ферментации кормов с различными вариантами разрабатываемого консерванта на основе исследуемых природных штаммов молочнокислых бактерий. В качестве сравнения проводилось сенажирование и силосование растительных ресурсов и с применением химических консервантов и добавок. Полученные результаты свидетельствовали о том, что наименьшие потери ценных питательных веществ в заготовленном продукте, а также стабильность процесса ферментации отмечались в опытах с применением природных штаммов молочнокислых бактерий по сравнению с другими исследуемыми вариантами, где нередко содержание нежелательной масляной кислоты в корме для животных превышало допустимые нормы по ГОСТ Р 55986 (не более 0.1–0.3%).

Оценивая завершающую часть исследований по подбору наиболее эффективных лактобацилл из выделенных штаммов молочнокислых бактерий для консервирования растительных ресурсов, следует обратить внимание на следующие особенности. Анализ результатов исследований экспериментальной ферментации растительных масс козлятника и клевера с применением четырех штаммов лактобактерий позволил отдать предпочтение двум природным гомоферментативным штаммам *L. plantarum* RS3 и *L. plantarum* RS4, выделенных из природных источников (филосферы люцерны и клевера) и обладающих эффективным кислотообразованием, высокой осмоотолерантностью, слабой протеолитической активностью, что ранее подтвердилось и в ходе сбраживания растительного сока в модельной системе с монокультурами. В последующем применение биологического консерванта на основе природного гомоферментативного осмоотолерантного штамма *L. plantarum* RS4 в процессе сенажирования клевера

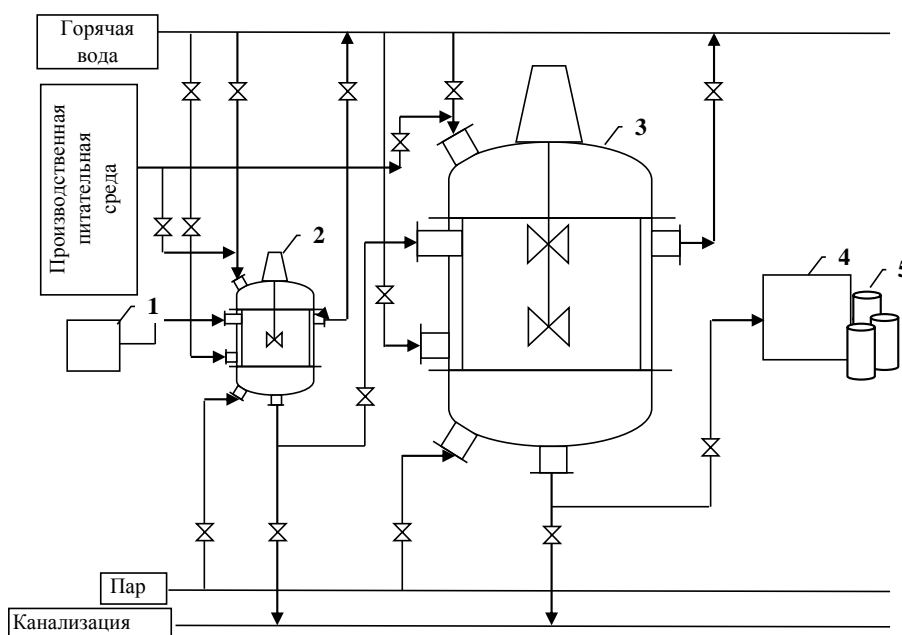


Рис. 4. Технологическая схема промышленного производства микробиологического препарата «Универсальная силосная закваска – БИОАГРО». Обозначения: 1 – отделение чистой культуры; 2 – инокулятор; 3 – ферментер; 4 – розлив и упаковка готовой продукции; 5 – пластиковые канистры

лугового оказалось более эффективным по сравнению с другими вариантами, на что указывают высокая концентрация молочной кислоты, сохранность питательных веществ, органолептические свойства, а также значительное снижение затрат на производство ферментированного корма [30]. Вместе с тем применение биологического консерванта на основе природного штамма *L. plantarum* RS3 в процессе консервирования растительной массы люцерны в фазе цветения также оптимизировало ферментативные процессы [31].

Таким образом, опытное консервирование и производственные испытания биоферментации бобовых трав позволили оценить влияние различных интродуцированных штаммов молочнокислых бактерий на формирование состава, качества и сохранность питательных веществ в процессе заготовки растительных ресурсов. Экспериментальные данные обеспечили поэтапный подбор из выделенных природных штаммов наиболее оптимальных лактобацилл для создания биологического консерванта с универсальными свойствами – микробиологического препарата «Универсальная силосная закваска – БИОАГРО» (УСЗ).

Разработанный микробиологический препарат УСЗ и оптимизированная технология консервирования повышают выход и качественные характеристики продукта, увеличивают его энергетическую ценность и оптимизируют экономические показатели технологического процесса заготовки кормов. Промышленное внедрение и испытание созданной УСЗ осуществляли в течение трех лет (2012–2014 гг.) в десяти хозяйствах восьми районах Республики Татарстан. С использованием предложенной технологии было произведено 15 т силосной закваски и заготовлено 225 тыс. т силоса и сенажа из различных сельскохозяйственных культур, в основном 1-го класса.

Полученные данные о технологических и производственно-ценных свойствах культур природных молочнокислых лактобацилл послужили основой для разработки технических условий на микробиологический препарат «Универсальная силосная закваска – БИОАГРО» (ТУ 9291-001-48672370-2015, зарегистрированные ФБУ «ЦСМ Татарстан» № 058/347675). На основании практических результатов разработана технологическая схема промышленного производства препарата (рис. 4), а также регламент и методика применения биологического консерванта в агрохозяйствах.

Таким образом, в результате проведенных исследований разработан и внедрен в промышленное производство микробиологический препарат «Универсальная силосная закваска – БИОАГРО» на основе двух новых штаммов *L. plantarum* RS3 и *L. plantarum* RS4, выделенных из природных источников. Применение препарата в сочетании с оптимизированной технологией биоконсервирования высокобелковых многолетних, однолетних злаковых трав, их смесей и кукурузы, и слабопроявленного растительного сырья в анаэробных условиях повышает качественные характеристики силоса и сенажа, а также увеличивает их энергетическую ценность и улучшает экономические показатели технологических процессов заготовки кормов.

Литература

1. Панов А.А., Рогачевская Н.С., Раменский В.А. Сравнительная эффективность применения бактериальных заквасок и химических консервантов при силосовании зеленых кормов // Материалы науч.-практ. конф. «Консервирование травяных кормов». – Таллин, 1988. – С. 18–20.
2. Schmidt R.J., Hu W., Mills J.A., Kung L.Jr. The development of lactic acid bacteria and *Lactobacillus buchneri* and their effects on the fermentation of alfalfa silage // J. Dairy Sci. – 2009. – V. 92, No 10. – P. 5005–5010. – doi: 10.3168/jds.2008-1701.
3. Квасников Е.И. Биология молочнокислых бактерий. – Ташкент: Изд-во АН УзССР, 1960. – 351 с.
4. Квасников Е.И. Исследование молочнокислых бактерий и разработка принципов регулирования их жизнедеятельности // Микробиол. журн. (Киев) – 1967. – Т. 29, № 5. – С. 400–413.
5. Квасников Е.И., Нестеренко О.А. Методы выделения, культивирования и хранения молочнокислых бактерий // Прикл. биохим. и микробиол. – 1968. – Т. 4, № 1. – С. 68–75.
6. Победнов Ю.А. Теоретическое обоснование и разработка способов приготовления энергонасыщенных высокопротеиновых силосованных кормов на основе регулирования микробиологических процессов: Дис. ... д-ра с.-х. наук. – М., 2003. – 296 с.
7. Победнов Ю.А. Факторы и приемы, обуславливающие стабильность силоса из провяленных трав при хранении и выемке // Адаптивное кормопроизводство. – 2011. – № 2. – С. 41–50.
8. Pang H., Zhang M., Qin G., Tan Z., Li Z., Wang Y., Cai Y. Identification of lactic acid bacteria isolated from corn stovers // Anim. Sci. J. – 2011. – V. 82, No 5. – P. 642–653. – doi: 10.1111/j.1740-0929.2011.00894.x.
9. O'Donnell M.M., O'Toole P.W., Ross R.P. Catabolic flexibility of mammalian-associated lactobacilli // J. Microbiol. Cell Fact. – 2013. – V. 12, No 48. – doi: 10.1186/1475-2859-12-48.
10. Квасников Е.И., Нестеренко О.А. Молочнокислые бактерии и пути их использования. – М.: Наука, 1975. – 384 с.

11. Мак-Дональд П. Биохимия силоса. – М.: Агропромиздат, 1985. – 272 с.
12. Valerio F., Lavermicocca P., Pascale M., Visconti A. Production of phenyllactic acid by lactic acid bacteria: an approach to the selection of strains contributing to food quality and preservation // J. FEMS Microbiol. Lett. – 2004. – V. 233, No 2. – P. 289–295. – doi: 10.1111/j.1574-6968.2004.tb09494.x.
13. Weinberg Z.G., Khanal P., Yildiz C., Chen Y., Arieli A. Effects of stage of maturity at harvest, wilting and LAB inoculant on aerobic stability of wheat silages // Anim. Feed Sci. Technol. – 2010. – V. 158. – P. 29–35.
14. Heinritz S.N., Martens S.D., Avila P., Hoedtke S. The effect of inoculant and sucrose addition on the silage quality of tropical forage legumes with varying ensilability // Anim. Feed Sci. Technol. – 2012. – V. 174, No 3–4. – P. 201–210.
15. Vlková E., Rada V., Bonešova V., Ročková Š. Growth and survival of lactic acid bacteria in lucerne silage // J. Folia Microbiol. (Praha). – 2012. – V. 57, No 4. – P. 359–362.
16. Буряко И.А., Шыбеко Е.А., Стефанович Л.И., Беликова В.Л. Выделение бактерий рода *Lactobacillus* – активных кислотообразователей из растительных источников // Микробиология. – 1997. – № 4. – С. 527–531.
17. Рамонова Э.В. Выделение и идентификация местных штаммов молочнокислых микроорганизмов и их использование в качестве пробиотиков: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Владикавказ, 2011. – 24 с.
18. Шурхно Р.А., Гареев Р.Г., Абульханов А.Г., Валидов Ш.З., Боронин А.М., Наумова Р.П. Ферментация высокобелковой растительной массы с интродукцией молочнокислых бактерий // Прикл. биох. и микробиол. – 2005. – Т. 41, № 1. – С. 79–89.
19. Шурхно Р.А., Сироткин А.С. Свойства штаммов молочнокислых бактерий, используемых для ферментации высокобелковой растительной массы (обзор) // Вестн. Казан. технол. ун-та. – 2015. – Т. 18, № 10. – С. 227–232.
20. Шурхно Р.А., Норина Е.С., Шайтанов О.Л., Гареев Р.Г. Оценка устойчивости микробных сообществ в прикорневой зоне кормовых бобовых трав // Нива Татарстана. – 2003. – № 5–6. – С. 34–40.
21. Шурхно Р.А., Шайтанов О.Л., Гареев Р.Г., Наумова Р.П. Микробиологический статус ризосферы многолетних бобовых трав как критерий оценки и прогноза состояния почвы // Сельскохозяйственная биология. – 2004. – № 3. – С. 61–66.
22. Шурхно Р.А., Королева Н.В., Шайтанов О.Л. Биологическая активность прикорневой зоны многолетних бобовых культур // Пути мобилизации биологических ресурсов повышения продуктивности пашни, энергоресурсосбережения и производства конкурентноспособной сельскохозяйственной продукции: Сб. науч. тр. – Казань: Фолиант, 2005. – С. 327–337.
23. Шурхно Р.А., Королева Н.В., Наумова Р.П. Биологические свойства корнеобитаемой зоны многолетних бобовых трав // Докл. РАСХН. – 2006. – № 3. – С. 31–36.
24. Шурхно Р.А., Норина О.С., Тагиров М.Ш., Наумова Р.П. Активность ризосферы многолетних бобовых трав в условиях биологического земледелия // Докл. РАСХН. – 2008. – № 6. – С. 23–26.
25. Naser S.M., Dawyndt P., Hoste B., Gevers D., Vandemeulebroecke K., Cleenwerck I., Vancanneyt M., Swings J. Identification of lactobacilli by *pheS* and *rpoA* gene sequence analyses // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2007. – V. 57. – P. 2777–2789. – doi: 10.1099/ijs.0.6471-0.
26. Шурхно Р.А., Вологин С.Г., Гибадуллина Ф.С., Тагиров М.Ш. Скрининг природных штаммов молочнокислых бактерий и их таксономическая идентификация // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 2, Ч. 1. – URL: www.science-education.ru/122-21189.

27. Шурхно Р.А., Валидов Ш.З., Боронин А.М., Наумова Р.П. Моделирование молочнокислого сбраживания соков бобовых растений // Прикл. биох. и микробиол. – 2006. – Т. 42, № 2. – С. 229–235.
28. Пат. 2309605 РФ. Способ диагностики силосуемости растений / Р.А. Шурхно, Ш.З. Валидов, Т.Г. Хадеев, Р.П. Наумова, О.Н. Ильинская. – № 2005100414/13; заявл. 11.01.2005. опублик. 10.11.2007. Бюл. 31. – 9 с.
29. Shurkhno R.A., Validov Sh. Z., Ilinskaya O.N. Screening of antagonistic activity of lactic acid bacteria strains in relation to *Candida scotti* for optimal conservation of plant juices // J. Agric. Stud. – 2014. – V. 2, No 2. – P. 21–31.
30. Шурхно Р.А., Гибадуллина Ф.С., Тагиров М.Ш. Интродукция природного штамма *Lactobacillus* sp. RS4 при сенажировании клевера лугового // Достижения науки и техники АПК. – 2015. – Т. 29, № 5. – С. 75–79.
31. Шурхно Р.А., Ильинская О.Н., Гибадуллина Ф.С., Фаттахова З.Ф. Ферментация растительной массы люцерны изменчивой с применением универсальной силосной закваски // Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов: Сб. науч. тр. – М.: ИД «Типография» Россельхозакадемии, 2014. – С. 266–275.

Поступила в редакцию
16.12.15

Шурхно Равиля Абдулловна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, руководитель Центра аналитических исследований

Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства
Оренбургский тракт, д. 48, г. Казань, 420059, Россия
E-mail: Ravillya@yandex.ru

ISSN 1815-6169 (Print)
ISSN 2500-218X (Online)

UCHENYE ZAPISKI KAZANSKOGO UNIVERSITETA. SERIYA ESTESTVENNYE NAUKI
(Proceedings of Kazan University. Natural Sciences Series)

2016, vol. 158, no. 1, pp. 5–22

**A Microbiological Preparation Based on the Homofermentative Strains of *Lactobacillus plantarum* Isolated from the Natural Sources for Bioconservation of Plant Resources
(Review of Studies between 2000 and 2015)**

R.A. Shurkhno

Tatar Research Institute of Agriculture, Kazan, 420059 Russia
E-mail: Ravillya@yandex.ru

Received December 16, 2015

Abstract

The paper reviews studies performed by the author for improving the process of bioconservation of plant resources by creating an effective microbiological preparation based on the active strains of lactic acid bacteria. It is known that the problem of production of biological preservatives can be solved by using the basic principles of microbiological and biotechnological processes that contribute to the creation of biological preservatives ensuring the most optimal and efficient fermentation of plant mass, i.e., by using homofermentative lactic acid bacteria (*Lactobacillus plantarum*) isolated from the natural ecological niches, as well as by conservation of plant mass with the help of lactic acid bacteria at the stage of high

physiological activity. In view of the above features, a microbial preparation “Universal Silage Ferment – BIOAGRO” was developed on the basis of two new strains of *Lactobacillus plantarum* RS3 and *L. plantarum* RS4, both isolated from natural sources, and implemented in the industrial production. Industrial introduction and testing of the microbiological preparation was carried out for 3 years (2012–2014) in ten farms of eight districts of the Republic of Tatarstan (Russia). It was found that the use of the preparation along with an optimized technology of bioconservation of high-protein perennials, annual grasses, their mixtures and corn, and slightly dried herbs in anaerobic conditions improves the qualitative characteristics of silage and haylage, as well as increases their energy value and enhances the economic performance of technological processes of fodder conservation.

Keywords: lactic acid bacteria, epiphytic microflora, identification, bioconservation, plant mass, organic acids, active acidity, biological preservative

Figure captions

- Fig. 1. The abundance of physiological groups of microorganisms in the phyllosphere of perennial legume grasses.
- Fig. 2. Dynamics of the abundance of microorganisms in the rhizosphere of legume grasses. Key: 1 – control variant, 2 – clover, 3 – alfalfa, 4 – galega.
- Fig. 3. Changes in the abundance of lactic acid bacteria with the yeast culture during the fermentation of plant juices.
- Fig. 4. Technological scheme showing industrial production of the microbial preparation “Universal Silage Ferment – BIOAGRO”. Key: 1 – pure-culture department; 2 – inoculator; 3 – fermentor; 4 – filling and packing of the finished product; 5 – plastic tanks.

References

1. Panov A.A., Rogachevskaya N.S., Ramenskii V.A. Comparative efficiency of bacterial ferments and chemical preservatives when ensiling green fodder. *Materialy nauchno-prakticheskoy konferencii “Konservirovanie travyanykh kormov”* [Proc. Sci. Conf. “Conservation of Herbal Fodder”]. Tallin, 1988, pp.18–20. (In Russian)
2. Schmidt R.J., Hu W., Mills J.A., Kung L.Jr. The development of lactic acid bacteria and *Lactobacillus buchneri* and their effects on the fermentation of alfalfa silage. *J. Dairy Sci.*, 2009, vol. 92, no. 10, pp. 5005–5010. doi: 10.3168/jds.2008-1701.
3. Kvasnikov E.I. Biology of Lactic Acid Bacteria. Tashkent, Izd. Akad. Nauk UzSSR, 1960. 351 p. (In Russian)
4. Kvasnikov E.I. Studying of lactic acid bacteria and developing principles of regulation of their life. *Mikrobiol. Zh. (Kiev)*, 1967, vol. 29, no. 5, pp. 400–413. (In Russian)
5. Kvasnikov E.I., Nesterenko O.A. Methods of isolation, cultivation, and storage of lactic acid bacteria. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, 1968, vol. 4, no. 1, pp. 68–75. (In Russian)
6. Pobednov Yu.A. Theoretical substantiation and development of methods of preparing high energy and protein silage fodder based on control of microbiological processes. *Doctoral Agric. Sci. Diss.*, Moscow, 2003. 296 p. (In Russian)
7. Pobednov Yu.A. Factors and techniques ensuring stability of silage out of cured herbs during storage and takeout. *Adapt. Proizvod.*, 2011, no. 2, pp. 41–50. (In Russian)
8. Pang H., Zhang M., Qin G., Tan Z., Li Z., Wang Y., Cai Y. Identification of lactic acid bacteria isolated from corn stovers. *Anim. Sci. J.*, 2011. vol. 82, no. 5, pp. 642–653. doi: 10.1111/j.1740-0929.2011.00894.x.
9. O’Donnell M.M., O’Toole P.W., Ross R.P. Catabolic flexibility of mammalian-associated lactobacilli. *J. Microbiol. Cell Fact.*, 2013, vol. 12, no. 48. doi: 10.1186/1475-2859-12-48.
10. Kvasnikov E.I., Nesterenko O.A. Lactic Acid Bacteria and Ways of Using Them. Moscow, Nauka, 1975, 384 p. (In Russian)
11. McDonald P. Biochemistry of Silage. Spichkin N.M. (Transl.), Kamenskaya K.I. (Ed.). Moscow, Izd. Agropromizdat, 1985, 272 p. (In Russian)

12. Valerio F., Lavermicocca P., Pascale M., Visconti A. Production of phenyllactic acid by lactic acid bacteria: an approach to the selection of strains contributing to food quality and preservation. *J. FEMS Microbiol. Lett.*, 2004, vol. 233, no. 2, pp. 289–295. doi: 10.1111/j.1574-6968.2004.tb09494.x.
13. Weinberg Z.G., Khanal P., Yildiz C., Chen Y., Arieli A. Effects of stage of maturity at harvest, wilting and LAB inoculant on aerobic stability of wheat silages. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2010, vol. 158, pp. 29–35.
14. Heinritz S.N., Martens S.D., Avila P., Hoedtke S. The effect of inoculant and sucrose addition on the silage quality of tropical forage legumes with varying ensilability. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2012, vol. 174, nos. 3–4, pp. 201–210.
15. Vlková E., Rada V., Bonešova V., Ročková Š. Growth and survival of lactic acid bacteria in lucerne silage. *J. Folia Microbiol. (Praha)*, 2012, vol. 57, no. 4, pp. 359–362.
16. Buryako I.A., Shybeko E.A., Stefanovich L.I., Belikova L.V. Isolation of bacteria of the genus *Lactobacillus* – active acidifiers from plant sources. *Mikrobiologiya*, 1997, no. 4, pp. 527–531. (In Russian)
17. Ramonova E.V. Isolation and identification of localized strains of lactic acid microorganisms and their use as probiotics. *Extended Abstract of Cand. Biol. Sci. Diss. Vladikavkaz*, 2011. 24 p. (In Russian)
18. Shurkhno R.A., Gareev R.G., Abul'khanov A.G., Validov Sh.Z., Boronin A.M., Naumova R.P. Fermentation of high-protein plant biomass by introduction of lactic acid bacteria. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2005, vol. 41, no. 1, pp. 69–78.
19. Shurkhno R.A., Sirotkin A.S. The properties of lactic acid bacteria strains for the fermentation of high-protein plant mass (review). *Vest. Kazan. Technol. Univ.*, 2015, vol. 18, no. 10, pp. 227–232. (In Russian)
20. Shurkhno R.A., Norina E.S., Shaitanov O.L., Gareev R.G. Assessment of the stability of microbial communities in the root zone of forage legumes. *Niva Tatarstana*, 2003, nos. 5–6, pp. 34–40. (In Russian)
21. Shurkhno R.A., Shaitanov O.L., Gareev R.G., Naumova R.P. Microbiological status of the microflora in rhizosphere of perennial legumes as a criterion for the assessment and prediction of soil condition. *S.-kh. Biol.*, 2004, no. 3, pp. 61–66. (In Russian)
22. Shurkhno R.A., Koroleva N.V., Shaytanov O.L. Biological activity in the root zone of perennial legumes. *Puti mobilizatsii biologicheskikh resursov povysheniya produktivnosti pashni, energoresursosberezheniya i proizvodstva konkurentnosposobnoi sel'skokhozyaistvennoi produktsii* [Ways of Mobilization of Biological Resources to Improve the Productivity of Arable Land, Energy and Resource Conservation, and Competitiveness of Agricultural Products]. Kazan, Izd. Foliant", 2005. pp. 327–337. (In Russian)
23. Shurkhno R.A., Koroleva N.V., Naumova R.P. Biological properties of the root zone of perennial legumes. *Russ. Agric. Sci.*, 2006, no. 3, pp. 31–36. (In Russian)
24. Shurkhno R.A., Norina O.S., Tagirov M.Sh., Naumova R.P. Activity of the rhizosphere perennial leguminous grasses under conditions of biological agriculture. *Russ. Agric. Sci.*, 2008, vol. 34, no. 6, pp. 389–392.
25. Naser S.M., Dawyndt P., Hoste B., Gevers D., Vandemeulebroecke K., Cleenwerck I., Vancanneyt M., Swings J. Identification of lactobacilli by *pheS* and *rpoA* gene sequence analyses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2007, vol. 57, pt. 2, pp. 2777–2789. doi: 10.1099/ijs.0.6471-0.
26. Shurkhno R.A., Volgin S.G., Gibadullina F.S., Tagirov M.Sh. Screening of natural strains of lactic acid bacteria and their taxonomical identification. *Sovrem. Probl. Nauki Obraz.*, 2015, no. 2, pt. 1. URL: www.science-education.ru/122-21189. (In Russian)
27. Shurkhno R.A., Validov Sh.Z., Boronin A.M., Naumova R.P. Modeling of lactic acid fermentation of leguminous plant juices. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2006, vol. 42, no. 2, pp. 204–209.
28. Shurkhno R.A., Validov Sh.Z., Khadeev T.G., Naumova R.P., Il'inskaja O.N. Method for diagnosis of plant ensilage capacity. Patent RF no. 2309605, 2007. (In Russian).
29. Shurkhno R.A., Validov Sh.Z., Ilinskaya O. N. Screening of antagonistic activity of lactic acid bacteria strains in relation to *Candida scotti* for optimal conservation of plant juices. *J. Agric. Stud.*, 2014, vol. 2, no. 2, pp. 21–31.
30. Shurkhno R.A., Gibadullina F.S., Tagirov M.Sh. Introduction of the native strain of *Lactobacillus* sp. *RS4* when haylaging meadow clover. *Dostizh. Nauki Tekh. APK*, 2015, vol. 29, no. 5, pp. 75–79. (In Russian)

31. Shurkhno R.A., Ilinskaya O.N., Gibadullina F.S., Fattakhova Z.F. Fermentation of the plant mass of California burclover using the universal silage preservative. *Perspektivnye fermentnye preparaty i biotekhnologicheskie protsessy v tekhnologiyakh produktov pitaniya i kormov* [Promising Enzyme Preparations and Biotechnological Processes in the Technologies of Food and Fodder Products]. Moscow, ID "Типография" Rossel'khozakademii, 2014, pp. 266–275.
-

Для цитирования: Шурхно Р.А. Микробиологический препарат на основе гомоферментативных штаммов *Lactobacillus plantarum*, выделенных из природных источников для биоконсервирования растительных ресурсов (обзор проведенных исследований в период с 2000 по 2015 г.) // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2016. – Т. 158, кн. 1. – С. 5–22.

For citation: Shurkhno R.A. A microbiological preparation based on the homofermentative strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from the natural sources for bioconservation of plant resources (review of studies between 2000 and 2015). *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2016, vol. 158, no. 1, pp. 5–22. (In Russian)