

AKTYVIŲ BAKTERIJŲ IZOLIATŲ, SLOPINANČIŲ SILOSO GEDIMĄ SUKELIANČIAS MIELES, PAIEŠKA

Algimantas Paškevičius¹, Jurgita Švedienė¹, Vytautas Melvydas², Jūratė Repečkienė¹, Danguolė Bridžiuvienė¹

¹*Biodestruktorių tyrimo laboratorija, Botanikos institutas, Gamtos tyrimų centras*

Žaliųjų ežerų g. 49, LT-08406 Vilnius; tel. (8~5) 271 1723; el. paštas: algimantas.paskevicius@botanika.lt

²*Genetikos laboratorija, Botanikos institutas, Gamtos tyrimų centras*

Žaliųjų ežerų g. 49, LT-08406 Vilnius; tel. (8~5) 272 9363; el. paštas: vytautas.melvydas@botanika.lt

Santrauka. Šio darbo tikslas – nustatyti T1x, T2x, T3x, Ux ir Ux308 bakterijų izoliatų poveikį iš silosuotų pašarų išskirtoms mielėms. Bakterijų izoliatai T1x, T2x, T3x, Ux išskirti iš spontaninių raugų, Ux308 – iš dirvožemio. Tyrimams panaudotos *Aureobasidium*, *Cryptococcus*, *Candida*, *Geotrichum*, *Pichia*, *Rhodospiridium* ir *Rhodotorula* genčių mielės, palaikomos gyvų mikroorganizmų kolekcijoje. Bakterijų izoliatų kilerinis aktyvumas įvertintas pagal standartinę mielių *Saccharomyces cerevisiae* kileriškumo nustatymo metodiką, panaudojant kontrolinius standartinius *S. cerevisiae* kilerinius kamienus K7, M437, MS300, Rom-K100, DBY ir K28. Išaiškinta, kad bakterijų izoliatai T1x, T2x, T3x, Ux ir Ux308 žudančiai veikė silosuotuose pašaruose paplitusias mieles. Stipriausiu kileriniu poveikiu pašaruose paplitusioms mielėms išsiskyrė bakterijų izoliatas Ux308. Didesnes nei 20 mm lizės zonas Ux308 izoliatas formavo kultivuojamas ant *Candida utilis* C.Ut.1, *Aureobasidium pullulans* A.P.1 ir *Rhodotorula mucilaginosa* Rh.M.1 gazonų. Tyrimų metu nustatyta, jog kontroliniai standartiniai *Saccharomyces cerevisiae* kileriniai kamieniai silosuotuose pašaruose paplitusioms mielėms jokio poveikio nedarė. Pirminiai duomenys parodė, kad po detalesnių biocheminių ir toksikologinių tyrimų išskirti bakterijų izoliatai gali būti panaudoti kovai su siloso mikrobiologinės kilmės ydų sukėlėjais.

Raktažodžiai: silosas, mielės, bakterijos, kilerinis aktyvumas.

THE SEARCH OF ACTIVE BACTERIAL STRAINS AGAINST YEAST-CAUSED TAINTS OF SILAGE

Algimantas Paškevičius¹, Jurgita Švedienė¹, Vytautas Melvydas², Jūratė Repečkienė¹, Danguolė Bridžiuvienė¹

¹*Laboratory of Biodeterioration Research, Institute of Botany, Nature Research Centre*

Žaliųjų ežerų str. 49, LT-08406 Vilnius, Lithuania

Tel. +370 5 271 17 23; e-mail: algimantas.paskevicius@botanika.lt

²*Laboratory of Genetics, Institute of Botany, Nature Research Centre*

Žaliųjų ežerų str. 49, LT-08406 Vilnius, Lithuania; Tel. +370 5 272 93 63; e-mail: vytautas.melvydas@botanika.lt

Abstract. The objective of this work was to screen the killer action of the bacterial isolates T1x, T2x, T3x, Ux and Ux308 against spoilage yeasts in silage. The bacterial isolates T1x, T2x, T3x, Ux308 were isolated from spontaneous fruit and berry fermentations and the Ux308 – from soil. Yeasts of *Aureobasidium*, *Cryptococcus*, *Candida*, *Geotrichum*, *Pichia*, *Rhodospiridium* and *Rhodotorula* genera in the experiments were used and they are maintained in the living culture collection. The killer ability was tested using routine methods and standard yeasts *Saccharomyces cerevisiae* killer strains K7, M437, MS300, Rom-K100, DBY, K28 were employed as a control. The results of the investigation showed that bacterial isolates T1x, T2x, T3x, Ux and Ux308 exhibited a killer activity against silage spoilage yeasts. The bacterial isolate Ux308 displayed a very strong killer action and formed clear more than 20 mm diameter growth inhibition zones on the lawn of *Candida utilis* C.Ut.1, *Aureobasidium pullulans* A.P.1 and *Rhodotorula mucilaginosa* Rh.M.1. The standard killer strains *Saccharomyces cerevisiae* K7, M437, MS300, Rom-K100, DBY, K28 had no killer effect on the investigated silage spoilage yeasts. The obtained primary results showed that after detailed biochemical and toxicological assay bacterial isolates could be used for silage protection from microbiological agents.

Keywords: silage, yeast, bacteria, killer activity.

Įvadas. Didelę augalinės kilmės žaliavų ir pašarų gautojų dalį sudaro įvairių rūšių mikromicetai, kurių neigiamas poveikis seniai žinomas. Besivystydami ant žaliavų ir pašarų, jie gali išskirti antrinius metabolitus – mikotoksinus. Gyvuliai, šeriami tokiais pašarais, apsinuodija, sumažėja jų atsparumas ligoms, krenta produktyvumas, kinta produkcijos kokybė, dėl to žemės ūkio įmonės patiria labai didelių nuostolių (Bakutis, Januškevičienė, 1997; Brake et al., 2000; Drochner et al., 2001; Yiannikouris, Jouany, 2002; Lugauskas et al.,

2006). Mielės dažnai laikomos visiškai nekenksmingomis ir kartais jų specialiai pridedama į pašarus, nes tai labai vertingas gyvulių ir paukščių raciono baltymų bei vitaminų šaltinis, didinantis pašarų biologinę vertę (Williams et al., 1991). Mielėmis kartais sprendžiama ir mikotoksinų detoksikavimo pašaruose problema (Stanley et al., 1993; Schatzmayr et al., 2003; Druvefors, Schnürer, 2005).

Nustatyta, kad mielės gali būti ne tik naudingos, bet ir žalingos. Kai kurių rūšių mielės gali neigiamai veikti

silosuotų pašarų kokybę, nes skaido silose esančią pieno rūgštį ir skatina siloso kaitimą bei vertingų medžiagų irimą (Woolford, Wilkie, 1984; Middelhoven et al., 1990). Pagrindinis veiksnys, lemiantis mielių paplitimą silose, yra cukraus kiekis augalinėje žaliavoje. Paprastai silosuotuose pašaruose, turtinguose baltymų, mielių yra mažiau nei tuose, kur cukraus yra daugiau (Middelhoven, Franzen, 1986; Middelhoven, 1998). Nepriklausomai nuo siloso saugyklų ir taikomos silosavimo technologijos, silosavimo principai yra tie patys. Norint užtikrinti tinkamą fermentacijos procesą ir pagaminti gerą silosą, reikia prisilaikyti šių pagrindinių kriterijų: turi būti tinkama silosuotos masės drėgmė, pakankamai cukraus augaluose, greitai sudaryti anaerobines sąlygas gerai suslegiant ir sandariai uždengiant (Porter, Murray, 2001; Jatkauskas ir kt., 2002; O'Brien et al., 2007; Jatkauskas, Vrotniakienė, 2009).

Norint apsaugoti pašarus nuo nepageidaujamos mikroorganizmų veiklos, taikomos priemonės turi atitikti tam tikrus reikalavimus, kurie užtikrintų visišką nekenksmingumą produkcijai, kartu – ir gyvuliams. Pašarų apsaugai naudojami įvairūs konservantai ir preparatai, kuriais pašarai ne tik užkonservuojami, bet ir papildomi mikroorganizmais, dalyvaujančiais maistinių medžiagų absorbavimo procese (Lindgren, Dobrogosz, 1990; Kitamoto et al., 1993; Merry et al., 1995; Merry, Davies, 1999; Lowes et al., 2000; Druvefors, Schnürer, 2005). Konservantų antimikrobinio veikimo pagrindas yra mikroorganizmų fermentinių sistemų slopinimas, tačiau šios yra panašios tiek mikroorganizmų, tiek kitų organizmų ląstelėse, jos gali neigiamai veikti įvairių organizmų ląsteles (Carballo et al., 2006; Tsay et al., 2007).

Fungicidinio poveikio medžiagas gali produkuoti įvairūs mikroorganizmai. Bakterijos geba produkuoti toksiškus baltymus, vadinamus bakteriociniais. Daugelio rūšių bakterijų išskiriami metabolitai priklauso poliketidiniais dariniais ir veikia kaip antibiotikai, imunosupresantai, priešvėžiniai, antiparazitiniai preparatai (Levenfors et al., 2004). Bakterijų *Pseudomonas aeruginosa* padermės produkuoja pirrolnitriną ir pseudomoninę rūgštį, kurios fungicidiškai veikia *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* ir *C. tropicalis* rūšių mieles (Kaleli et al., 2006). Iš *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* rūšies bakterijų išskirti syringomicino E, syringotoksino B ir syringostatino A baltymai *in vitro* tyrimų metu fungicidiškai veikė patogenines *Cryptococcus*, *Candida* ir *Aspergillus* genčių padermes (Sorensen et al., 1996). *Pseudomonas syringae* rūšies bakterijos sintetina pseudomicinus – antimikrobinis peptidas, kurie stipriai fungicidiškai veikia *C. albicans* rūšies mieles (Harrison et al., 1991). *Streptomyces tendae* rūšies produkuojamas baltymas nikomicinas Z aktyviai veikia daugelį patogeninių grybų ir mielių rūšių, įskaitant ir *C. albicans* rūšies mieles (Li, Rinaldi, 1999).

Pieno rūgšties bakterijos fungicidiškai veikia *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* ir kitų genčių mikromicetus (Lavermicocca et al., 2000; Schnürer, Magnusson, 2005), taip pat *Candida* ir

Saccharomyces genčių mieles (Makanjuola et al., 1992; Okkers et al., 1999; Atanassova et al., 2003).

Įvairių pasaulio šalių mokslininkai intensyviai ieško natūralios kilmės medžiagų pašarų kokybei užtikrinti, nes nuo kokybiškų pašarų priklauso ne tik gyvulių produktyvumas, bet ir sveikata.

Darbo tikslas – įvertinti naujai išskirtų mikroorganizmų T1x, T2x, T3x, Ux ir Ux308 sekretuojamus toksinus – biologinės kovos priemone prieš siloso gedimą sukeliančias mieles.

Medžiagos ir metodai. Bakterijų izoliatai T1x, T2x, T3x Ux išskirti iš spontaninių vaisių ir uogų raugų. Ux308 bakterijų izoliatas išskirtas iš dirvožemio mėginio (Kryžkalnis, Lietuva). Įvairių rūšių mielės buvo išskirtos 2003–2004 m. iš silosuotų pašarų (LŽŪU Mokomasis ūkis, Kauno rajonas) įgyvendinant Lietuvos valstybinio mokslo ir studijų fondo kompleksinę programą „Mikotoksinų kaupimosi maiste dėsningumai ir prevencinių saugos priemonių sukūrimas“ (Nr. C-04/2003). Tyrimams panaudotos tokios mielių padermės: *Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud (A.P.1), *Cryptococcus albidus* (Saito) C. E. Skinner (Cr.A.1), *Candida kruisii* (Kock.-Krat. & Ondrush.) S. A. Mey. & Yarrow (C.Kr.1), *Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron & Talice (C.P.P.1), *Candida utilis* (=Cyberlindnera jadinii) (Henneberg) Lodder & Kreger-van Rij (C.Ut.1), *Candida valida* (=Pichia membranifaciens) (Leberle) Uden & H. R. Buckley ex S. A. Mey. & Ahearn (C.V.1), *Candida rugosa* (=Candida rugosa var. elegans) (H. W. Anderson) Diddens & Lodder (C.R.3), *Geotrichum fermentans* (Diddens & Lodder) Arx (G.F.1), *Pichia guilliermondii* (=Meyerozyma guilliermondii) Wick. (P.G.1), *Rhodospiridium diobovatum* S. Y. Newell & I. L. Hunter (Rd.D.1) ir *Rhodotorula mucilaginos* (A. Jörg.) F. C. Harrison (Rh.M.1). Mielėms išskirti naudotos Saburo („Oxoid“, Anglija) ir alaus misos terpės su antibiotikais ir „Rose Bengal CAF“ („Liofilchem“, Italija) dažais. Išskirti mielių izoliatai identifikuoti naudojantis C. P. Kurtzman ir J. W. Fell (1998) žinyne bei teikiamomis metodinėmis rekomendacijomis. Mielėms identifikuoti taip pat panaudotos „Candifast“ ir „Fungichrom“ („International Microbio“, Prancūzija) bei Api 20 C AUX (bioMérieux, Anglija) diagnostinės sistemos.

Bakterijų izoliatų kilerinis aktyvumas nustatomas pagal testuojamų kamienų gebėjimą ant testerinio kamieno gazono suformuoti lizės zonas. Kadangi visų tipų kileriniai toksinai yra aktyvūs esant pH 4,8, visi eksperimentai atlikti naudojant kilerinio fenotipo testavimui skirtą terpę su metileno mėliu (YPED MB). Naudotas *S. cerevisiae* kamienas 01 (MAT α , leu2-2 [kil-0]), jautrus bet kokio tipo toksinui. *S. cerevisiae* kontroliniai kileriniai kamieniai yra šie: K7 (MAT α , leu2-2 [kil-0]); Rom-K100 – laukinis tipas (wt, HM/HM [kil-K2]); M437 – laukinis tipas (wt, HM/HM [kil-K2]); DBY4975 (MAT α ade 2 his3-200 leu2-3-112 lys2-801 ura3-52 gal [kil-K1]); K28 (wt, HM/HM [kil-K28]); MS300 (MAT α leu2 ma 3-52 (IOL-K28) (Melvydas et al., 2005).

Mielės buvo auginamos ant YEPD terpės, kurios sudėtis tokia: 1g/ml mielių ekstrakto, 2g/ml peptono,

2g/ml gliukozės bei 2g/ml agaro. Mielės 3 paras inkubuotos 20–25°C temperatūroje. Pagal lizės zonos dydį (mm) sprendžiama apie testuojamų kamienų kilerinį aktyvumą.

Gauti rezultatai (vidurkis, standartinis nuokrypis) apdoroti *Microsoft Excel* programa.

Tyrimų rezultatai. Tyrimų rezultatai parodė, kad bakterijų T1x, T2x, T3x, Ux ir Ux308 išskiriamos

medžiagos pasižymi kileriniu poveikiu silosuojamuose pašaruose paplitusioms *Aureobasidium*, *Cryptococcus*, *Candida*, *Geotrichum*, *Pichia*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula* genčių mielėms. Kontroliniai standartiniai *S. cerevisiae* kileriniai kamieniai K7, M437, MS300, Rom-K100, DBY, K28 tirtoms mielių rūšims jokio poveikio nedarė (lentelė).

Lentelė. **Bakterijų izoliatų ir standartinių *Saccharomyces cerevisiae* kilerinių kamienų poveikis** (lizės zonų skersmuo, mm) **silosuotų pašarų gedimą sukeliančioms mielėms**

Mielių rūšys	Standartiniai <i>Saccharomyces cerevisiae</i> kileriai						T1x	T2x	T3x	Ux	Ux308
	M437	Rom-K100	K7	K28	DBY	MS300					
<i>Aureobasidium pullulans</i> A.P.1	-	-	-	-	-	-	10,0±0,4	11,0±0,1	10,0±0,4	6,0±0,5	20,0±0,8
<i>Cryptococcus albidus</i> Cr.A.1	-	-	-	-	-	-	9,0±0,6	9,0±0,5	8,0±0,1	10,0±0,5	15,0±0,7
<i>Candida kruisii</i> C.Kr.1	-	-	-	-	-	-	5,0±0,4	4,0±0,0	4,0±0,0	12,0±0,5	10,0±0,8
<i>Candida parapsilosis</i> C.P.P.1	-	-	-	-	-	-	7,0±0,5	7,0±0,5	8,0±0,4	-	18,0±0,4
<i>Candida utilis</i> C.Ut.1	-	-	-	-	-	-	2,0±0,1	4,0±0,4	3,0±0,8	7,0±0,4	20,0±0,1
<i>Candida valida</i> C.V.1	-	-	-	-	-	-	2,0±0	3,0±0,1	3,0±0,1	5,0±0,4	8,0±0,5
<i>Candida rugosa</i> C.R.3	-	-	-	-	-	-	4,0±0,2	4,0±0,2	4,0±0,2	6,0±0,1	6,0±0,4
<i>Geotrichum fermentans</i> G.F.1	-	-	-	-	-	-	2,0±0,1	2,0±0,1	2,0±0,1	5,0±0,4	4,0±0,3
<i>Pichia guilliermondii</i> P.G.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10,0±0
<i>Rhodospiridium diobovatum</i> Rd.D.1	-	-	-	-	-	-	8,0±0,2	8,0±0,2	7,0±0,4	6,0±0,3	10,0±0,8
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> Rh.M.1	-	-	-	-	-	-	5,0±0,8	5,0±0,7	5,0±0,8	-	20,0±0,4



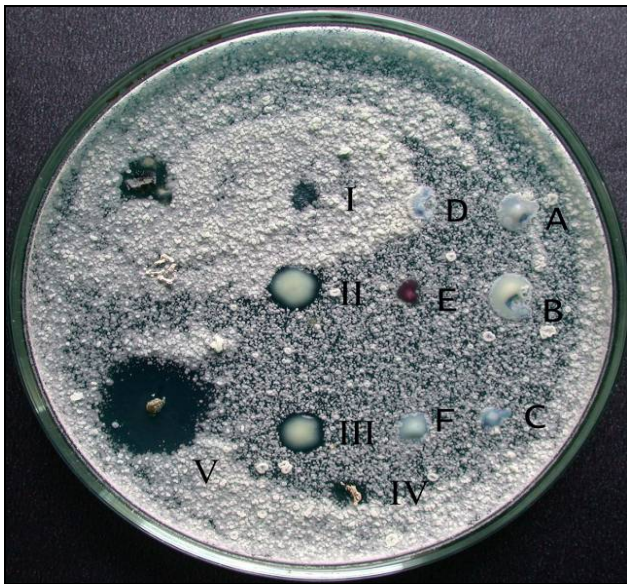
1 pav. **Bakterijų** (I–T1x; II–T2x; III–T3x; IV–Ux; V–Ux308) **izoliatų ir standartinių *S. cerevisiae*** (A–M437; B–Rom-K100; C–K28; D–K7; E–DBY; F–MS300) **kilerinių kamienų poveikis *Aureobasidium pullulans* A. P. 1 padermės mielėms**

Stipriausiu kileriniu poveikiu tirtoms pašaruose parazituojančioms mielėms išsiskyrė Ux308 bakterijų izoliatas. Kultivuojant Ux308 bakterijų izoliatą ant *Aureobasidium pullulans* A.P.1, *Candida utilis* C.Ut.1, *Rhodotorula mucilaginosa* Rh.M.1 mielių gazonų, susiformavo 20,0 mm dydžio lizės zonos. Tuo tarpu didžiausios bakterijų izoliatų T1x, T2x, T3x suformuotos lizės zonos ant *A. pullulans* A.P.1 gazono siekė nuo 10,0 mm iki 11,0 mm (1 pav.).

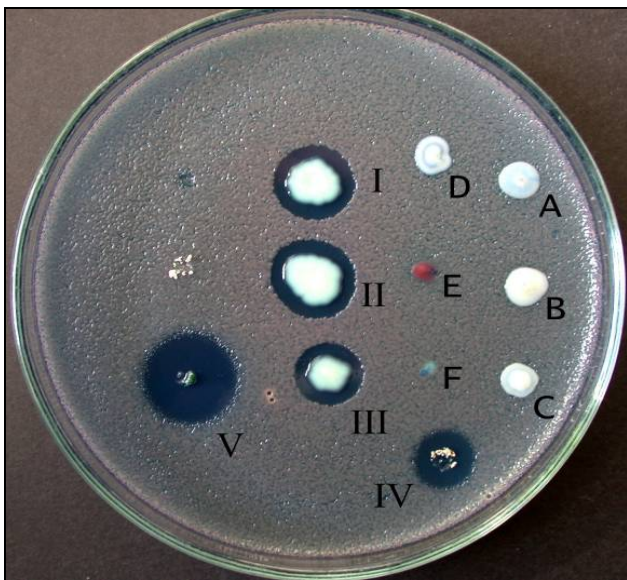
Tyrimų rezultatai parodė, kad bakterijų izoliatų T1x, T2x, T3x, Ux ir Ux308 išskiriamos medžiagos pasižymėjo kileriniu poveikiu pašaruose paplitusioms *Candida* genties mielėms. Standartiniai *S. cerevisiae* kileriniai kamieniai tirtoms *Candida* genties mielėms įtakos neturėjo. Auginant Ux308 bakterijų izoliatą ant *Candida* genties mielių gazonų, susidariusios lizės zonos siekė nuo 6,0 mm iki 20,0 mm.

Kultivuojant T1x, T2x, T3x izolatus ant *C. kruisii* C.Kr.1 ir *C. parapsilosis* C.P.P.1 mielių gazonų, suformuotos lizės zonos siekė 4,0–8,0 mm. Bakterijų izoliato Ux308 išskiriamos medžiagos šias mieles veikė fungicidiškai – susidariusios zonos siekė 18,0–20,0 mm. Atsparios T1x, T2x, T3x išskiriamoms medžiagoms buvo *C. utilis* C.Ut.1 ir *C. valida* C.V.1 mielės – lizės zonos

neviršijo 4,0 mm (2 pav.). Kultivuojant tiriamus bakterijų izoliatus T1x, T2x, T3x, Ux ir Ux308 ant *C. rugosa* C.R.3 mielių gazono, susidariusios lizės zonos neviršijo 6,0 mm.



2 pav. Bakterijų (I–T1x; II–T2x; III–T3x; IV–Ux; V–Ux308) izoliatų ir standartinių *S. cerevisiae* (A–M437; B–Rom-K100; C–K28; D–K7; E–DBY; F–MS300) kilerinių kaminų poveikis *Candida valida* C. V. 1 padermės mielėms



3 pav. Bakterijų (I–T1x; II–T2x; III–T3x; IV–Ux; V–Ux308) izoliatų ir standartinių *S. cerevisiae* (A–M437; B–Rom-K100; C–K28; D–K7; E–DBY; F–MS300) kilerinių kaminų poveikis *Rhodosporidium diobovatum* Rd. D. 1 mielėms

Išaiškinta, kad bakterijų izoliatai T1x, T2x, T3x pasižymėjo kileriniu poveikiu *Rhodotorula mucilaginosa* Rh.M.1 mielėms – susidariusios lizės zonos siekė 5,0 mm. Šios mielės buvo atsparios bakterijų izoliato Ux ir *S. cerevisiae* standartinių kilerinių kaminų poveikiui, tačiau

jautrios Ux308 izoliato išskiriamoms medžiagoms – lizės zona siekė 20,0 mm. Kilerinio poveikio bakterijų izoliatai T1x, T2x, T3x ir Ux nedarė *Pishia guilliermondii* P.G.1 mielėms, jos buvo jautrios tik Ux308 bakterijų izoliatui (lizės zona – 10 mm).

Auginant T1x, T2x, T3x izoliatus ant *Rhodosporidium diobovatum* Rd.D.1 mielių gazono, susidarė 7,0–8,0 mm lizės zonos (3 pav.). Ux308 žudančiai veikė *Rhodosp. diobovatum* Rd.D.1 mieles (zona siekė 10,0 mm). Ux išskiriamas toksinas darė silpnesnį poveikį šioms mielėms nei Ux308 bakterijų izoliatas – lizės zona siekė 6,0 mm.

Aptarimas. Norint užtikrinti tinkamą silosuojamos biomasės procesą ir pagaminti aukštos kokybės silosą, būtina prisilaikyti tokių pagrindinių sąlygų: turi būti tinkama silosuojamos biomasės drėgmė, pakankamas angliavandenių kiekis augaluose, greitai sudaryti anaerobines sąlygas. Per drėgna silosuojama masė netinka fermentacijai, nes silose padaugėja acto rūgšties, silosos parūgštėja. Silosavimui netinka ir per sausa masė, kurioje yra daugiau kaip 60 proc. sausųjų medžiagų, nes masė sunku tinkamai suslėgti (Lowe, 2000; Mikulionienė, Stankevičius, 2002). Optimalus sausųjų medžiagų kiekis silosuojamoje masėje turi būti nuo 30 iki 50 proc., jei daugiau – silosas kaista (Jukna ir kt., 1994). Gaminant silosą labai svarbu tinkamai paskleisti masę, ją gerai suslėgti ir izoliuoti nuo oro. Svarbiausi silosuojamų pašarų mikroorganizmai yra pieno rūgšties bakterijos, kurios iš augaluose esančio cukraus gamina pieno ir acto rūgštį. Rūgštys apsaugo pašarą nuo gedimo, todėl silosuojant pašarus būtina sudaryti palankias sąlygas pieno rūgšties bakterijoms daugintis (Middelhoven, 1998; Jatkauskas, Vrotniakienė, 2003). Pažeidus siloso ruošimo technologijas galimi dideli nuostoliai. Ypač dideli nuostoliai patiriami pažeidus anaerobinį silosavimo procesą, nes, susidarius palankioms sąlygoms, sparčiai pradeda vystytis mielės ir kiti mikromicetai, kurie gadina silosą. Ši fazė dažniausiai prasideda tada, kai pašaras imamas iš saugyklų, tačiau gali prasidėti ir tada, kai tranšėjos, kaupio ar ritinio apsauga yra pažeidžiama. Optimali mielių augimo temperatūra yra 25–27°C, bet jos neblogai toleruoja ir žemesnę arba aukštesnę temperatūrą (Davenport, 1980). Mielės geba augti terpėje esant plačiam pH (3–8) intervalui (Jonsson, 1989). Norint išvengti nuostolių, kuriuos sukelia mikroorganizmai, silosavimui naudojami tokie pagrindiniai konservantų tipai: organinės rūgštys ir nebaltyminis azotas, bakteriniai inokulatai ir fermentai bei papildomi angliavandenių šaltiniai. Organinės rūgštys naudojamos norint sumažinti biocheminių procesų aktyvumą, o nebaltyminis azotas (karbamidas, amoniakas) biocidiškai veikia nepageidaujamus mikroorganizmus, bet kartu sudaro geresnes sąlygas pieno rūgšties bakterijų vystymuisi (Kung et al., 2000; Aksu et al., 2006; Guo et al., 2007). Bakteriniai inokulatai spartina silosuojamos biomasės cukrų vartimą organinėmis rūgštimis, mažina siloso pH ir neleidžia daugintis kitiems mikroorganizmams, pristabdo baltymų skaidymą (Weinberg et al., 1993; Driehuis et al., 2001; Aksu et al., 2004).

Pastaruoju metu mokslininkai didelį dėmesį skiria pieno rūgšties bakterijoms ir nurodo, kad *Lactobacillus*

plantarum pasižymėjo fungicidiniu poveikiu *Saccharomyces cerevisiae* (Makanjuola et al., 1992), o *L. pentosus* – *Candida albicans* (Okkers et al., 1999) rūšies mieliagrybiams. Kiti mokslininkai (Ho et al., 2009) nurodo, kad *Lactobacillus gasserii* HA4, *L. fermentum* HA11, *L. acidophilus* HA12 labai silpnai fungicidiškai veikė *Aspergillus terreus*, *A. fumigatus*, *Absidia corymbifera*, *Paecilomyces lilacinus*, *Fusarium* sp., *Curvularia lunata* rūšių mikromicetus ir *Geotrichum candidum* bei *Candida albicans* rūšių mieliagrybius. *Propionibacterium jensenii* rūšies PJ702 padermė stipriai fungicidiškai veikė *A. terreus*, *P. lilacinus*, *Penicillium* sp., *S. brevicaulis* ir *C. lunata* rūšies mikromicetus, o *G. candidum* ir *C. albicans* rūšies mieliagrybius veikė labai silpnai.

Tyrimų rezultatai parodė, kad bakterijų izoliatai labai plačiai fungicidiškai veikė *Aureobasidium*, *Cryptococcus*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodosporidium*, *Pichia*, *Geotrichum* genčių mieliagrybius. Visi tirti bakterijų izoliatai stipriai fungicidiškai veikė *Aureobasidium pullulans* A.P.1 ir *Cryptococcus albidus* Cr. A. 1 rūšių mieles. Fungicidinės zonos sudarė atitinkamai nuo 6,0 iki 20,0 ir nuo 8,0 iki 15,0 mm. Silpniausias fungicidinis poveikis nustatytas *Pichia guilliermondii* P.G.1 rūšies mielėms. Iš visų tirtų bakterijų tik Ux308 izoliatas pasižymėjo fungicidiniu poveikiu ir sudarė 10,0 mm skersmens lizės zonas. Atsparios tirtų bakterijų poveikiui buvo ir *Rhodotorula mucilaginosa* rūšies Rh.M.1 padermės mielės. Bakterijų T1x, T2x ir T3x izoliatų veikiamų lizės zonų skersmuo buvo tik 5,0 mm, o bakterijų Ux izoliatas fungicidiniu aktyvumu visai nepasižymėjo. Literatūros duomenimis (Magnusson et al., 2003), pieno rūgšties bakterijos fungicidiškai aktyviai veikia *Rhodotorula mucilaginosa* rūšies mieles. Mūsų tyrimų rezultatai parodė, kad bakterijų Ux308 izoliatas taip pat stipriai fungicidiškai veikė *Rhodotorula mucilaginosa* rūšies Rh.M.1 padermės mieles ir sudarė 20,0 mm skersmens lizės zoną.

Tyrimų rezultatai parodė, kad išskirtos bakterijų padermės pasižymi stipriai kileriniu poveikiu siloso gedimą sukeliančioms mielėms ir gali vystytis rūgščioje terpėje. Manome, kad tyrimų duomenys yra pirminiai, bet pateikti laiku ir po detalesnių tyrimų išskirti bakterijų izoliatai gali būti panaudoti sprendžiant mikrobiologinės kilmės silosavimo problemas.

Išvados.

1. Nustatyta, jog bakterijų T1x, T2x, T3x, Ux ir Ux308 išskiriamos medžiagos pasižymi kileriniu poveikiu silosą gadinančioms *Aureobasidium*, *Cryptococcus*, *Candida*, *Geotrichum*, *Pichia*, *Rhodosporidium*, *Rhodotorula* genčių mielėms.

2. Stipriausiu biocidiniu poveikiu pašaruose paplitusioms mielėms pasižymėjo bakterijų izoliatas Ux308. Didesnes nei 20 mm lizės zonas Ux308 izoliatas formavo kultivuojamas ant *Candida utilis* C.Ut.1, *Aureobasidium pullulans* A.P.1 ir *Rhodotorula mucilaginosa* Rh.M.1 gazonų.

3. Pirminiai tyrimų duomenys parodė, kad po detalesnių biocheminių ir toksikologinių tyrimų išskirti bakterijų izoliatai gali būti panaudoti kovai su siloso

mikrobiologinės kilmės ydų sukėlėjais.

Padėka. Autoriai dėkingi Lietuvos valstybiniam mokslo ir studijų fondui už finansinę paramą, atliekant tyrimus pagal sutartis Nr. C-04/2003 ir Nr. 65/08.

Literatūra

1. Aksu T., Baytok E., Bolat D. Effects of a bacterial silage inoculant on corn silage fermentation and nutrient digestibility. *Small Rum. Res.*, 2004. Vol. 55. P. 249–252.

2. Aksu T., Baytok E., Karstl M. A., Muruz H. Effects of formic acid, molasses and inoculant additives on corn silage composition, organic matter digestibility and microbial protein synthesis in sheep. *Small Rum. Res.*, 2006. Vol. 61. P. 29–33.

3. Atanassova M., Choiset Y., Dalgalarondo M., Chobert J. M., Dousset X., Ivanova I., Haertlé T. Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain M3. *International Journal of Food Microbiology*, 2003. Vol. 87. P. 63–73.

4. Bakutis B., Januškevičienė G. Pašaruose vyraujančių mikotoksinų poveikis gyvulių sveikatai. *Žemės ūkio mokslai*, 1997. Vol. 4. P. 81–89.

5. Brake J., Hamilton P. B., Kittrell R. S. Effects of the trichothecene mycotoxin diacetoxyscirpenol on feed consumption, body weight, and oral lesions of broiler breeders. *Poult. Sci.*, 2000. Vol. 79. P. 856–863.

6. Carballo M. A., Hick A. S., Soloneski S., Larramendy M. L., Mudry M. D. Genotoxic and aneugenic properties of an imidazole derivative. *J. Appl. Toxicol.*, 2006. Vol. 26. P. 293–300.

7. Davenport R. R. An introduction to yeasts and yeast-like organisms. In: *Biology and Activities of Yeasts* (Ed. Skinner F. A., Passmore S. M., Davenport R. R.). *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.* New York, Academic Press, 1980. P. 1–27.

8. Driehuis F., Oude Elferink S. J. W. H., Van Wikselaar P. G. Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria. *Grass Forage Sci.*, 2001. Vol. 56. P. 330–343.

9. Drochner W., Lauber U. Occurrence of the three important *Fusarium* – toxins Deoxynivalenol, Nivalenol and Zearalenon in grains in Central Europe and effects in farm animals. *Proceedings of the Society of Nutrition Physiology*, 2001. P. 163–168.

10. Druvefors U. A., Schnürer J. Mold-inhibitory of different yeast species during airtight storage of wheat grain. *FEMS Yeast Research*, 2005. Vol. 5. P. 373–378.

11. Guo X. S., Ding W. R., Han J. G., Zhou H. Characterization of protein fractions and amino acids in ensiled alfalfa treated with different chemical additives. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2007. Vol. 55. P. 215–228.
12. Harrison L., Teplow D. B., Rinaldi M., Strobel G. Pseudomycins, a family of novel peptides from possessing broad-spectrum antifungal activity *Pseudomonas syringae*. *Journal of General Microbiology*, 1991. Vol. 137(12). P. 2857–2865.
13. Ho P. H., Luo J. B., Adams M. C. *Lactobacilli* and dairy *Propionibacterium* with potential as biopreservatives against food fungi and yeast contamination. *Applied Biochemistry and microbiology*, 2009. Vol. 45. P. 414–418.
14. Jatkauskas J., Vrotniakienė V. The influence of application of a biological additive on the fermentation and nutritive value of lucerne silage. *Žemdirbystė-Agriculture*, 2009. Vol. 96. P. 197–208.
15. Jatkauskas J., Vrotniakienė V. Žolinių pašarų konservavimo kryptys ir silosavimo priedų efektyvumas. *Veterinarija ir zootechnika*, 2003. T. 22. P. 35–39.
16. Jatkauskas J., Vrotniakienė V., Žukovienė R. Priemonės silosuočių pašarų kokybei baltymingumui ir ekonomiškumui didinti. *Kaunas, LGI*, 2002. 29 p.
17. Jonsson A. The role of yeasts and clostridia in silage deterioration: identification and ecology. Ph. D. Thesis, Uppsala, Swedish University of Agricultural Sciences. 1989.
18. Jukna Č. Andrus K., Alksninis A. Pieninė galvijininkystė JAV. *Kaunas*, 1994. 231 p.
19. Kaleli I., Cevahir N., Demir M., Yildirim U., Sahin R. Anticandidal activity of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical specimens. *Mycoses*, 2006. Vol. 50. P. 74–78.
20. Kitamoto H. K., Ohmomo S., Nakahara T. Selection of killer yeasts (*Kluyveromyces lactis*) to prevent aerobic deterioration in silage making. *J. dairy Sci.*, 1993. Vol. 76. P. 1057–1059.
21. Kung Jr. L., Robinson J. R., Ranjit N. K., Chen J. H., Golt C. M., Pesek J. D. Microbial populations, fermentation end-products and aerobic stability of corn silage treated with ammonia or a propionic acid-based preservative. *J. Dairy Sci.*, 2000. Vol. 83. P. 1479–1486.
22. Kurtzman C. P., Fell J. W. The yeasts, a taxonomy study. *Netherlands*, 1998. 1055 p.
23. Lavermicocca P., Valerio F., Evidente A., Lazzaroni S., Gobetti M. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000. Vol. 66. P. 4084–4090.
24. Levenfors J. J., Hedman R., Thaning C., Gerhardson B., Welch C. J. Broad-spectrum antifungal metabolites produced by the soil bacterium *Serratia plymuthica* A153. *Soil Biology & Biochemistry*, 2004. Vol. 36. P. 677–685.
25. Li R. K., Rinaldi M. G. *In vitro* Antifungal Activity of Nikkomycin Z in Combination with Fluconazole or Itraconazole. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1999. Vol. 43 (6). P. 1401–1405.
26. Lindgren S. E., Dobrogosz W. J. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentation. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1990. Vol. 87. P. 149–164.
27. Lowes K. F., Shearman C. A., Payne J., Kenzie D. M., Archer D. B., Merry R. J., Gasson M. J. Prevention of yeast spoilage in feed and food by the yeast mycocin HMK. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000. Vol. 66. P. 1066–1076.
28. Lugauskas A., Raila A., Railienė M., Raudonienė V. Toxic micromycetes in grain raw material during its processing. *AAEM*, 2006. Vol. 13. P. 147–161.
29. Magnusson J., Ström, Roos S., Sjögren J., Schnürer J. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS microbiology Letters*, 2003. Vol. 219. P. 129–135.
30. Makanjuola D. B., Tymon A., Springham D. G. Some effects of lactic-acid bacteria on laboratory-scale yeast fermentations. *Enzyme and Microbial Technology*, 1992. Vol. 14. P. 350–357.
31. Melvydas V., Černyšova O., Gedminienė G., Bernotaitė L. Possible new killer yeast strains and their primary analysis. *Botanica Lithuanica*, 2005. Vol. 11. P. 241–246.
32. Merry R. J., Davies D. R. Propionibacteria and their role in the biological control of aerobic spoilage in silage. *Lait*, 1999. Vol. 79. P. 149–164.
33. Merry R. J., Dhanoa M. S., Theodorau M. K. Use of freshly cultured lactic acid bacteria as silage inoculants. *Grass Forage Sci.*, 1995. Vol. 50. P. 112–123.
34. Middelhoven W. J. The yeast flora of maize silage. *Food technol. biotechnol.*, 1998. Vol. 36. P. 7–11.
35. Middelhoven W. J., Franzen M. M. The yeast flora of ensiled whole-crop maize. *J. Sci. Food Agri.*, 1986. Vol. 37. P. 855–861.
36. Middelhoven W. J., Jong I. M., Winter M. Yeasts and fungi occurring in ensiled whole-crop maize and other ensiled vegetable crops. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1990. Vol. 57. P. 153–158.
37. Mikulionienė S., Stankevičius R. Žolinių pašarų konservatų ir siloso cheminė sudėtis, maistinė vertė ir virškinamumas. *Veterinarija ir zootechnika*, 2002. T.

18. P. 94–100.
38. O'Brien M., O'Kiely P., Forristal P. D., Fuller H. T. Visible fungal growth on baled grass silage during the winter feeding season in Ireland and silage characteristics associated with the occurrence of fungi. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2007. Vol. 139. P. 234–256.
39. Okkers D. J., Dicks L. M. T., Silvester M., Joubert J. J., Odendaal H. J. Characterization of pentocin TV35b, a bacteriocin-like peptide isolated from *Lactobacillus pentosus* with a fungistatic effect on *Candida albicans*. *Journal of Applied Microbiology*, 1999. Vol. 87. P. 726–734.
40. Porter M. G., Murray R. S. The volatility of components of grass silage on oven drying and the interrelationship between dry-matter content estimated by different analytical methods. *Grass Forage Sci.*, 2001. Vol. 56. P. 405–411.
41. Schatzmayr G., Heidler D., Fuchs E., Mohnl M., Täubel M., Loibner A. P., Braun R., Binder E. M. Investigation of different yeast strains for the detoxification of ochratoxin A. *Proceedings: Mycotoxin Research*, 2003. Vol. 19. P. 124–128.
42. Schnürer J., Magnusson J. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science & Technology*, 2005. Vol. 16. P. 70–78.
43. Sorensen K. N., Kim K.-H., Takemoto J. Y. *In vitro* Antifungal and Fungicidal Activities and Erythrocyte Toxicities of Cyclic Lipodepsinonapeptides Produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1996. Vol. 40 (12). P. 2710–2713.
44. Stanley V. G., Ojo R., Woldesenbet S., Hutchinson D. H. The use of *Saccharomyces cerevisiae* to suppress the effects of aflatoxicosis in broiler chicks. *Poult. Sci.*, 1993. Vol. 72. P. 1867–1872.
45. Tsay H. J., Wang Y. H., Chen W. L., Huang M. Y., Chen Y. H. treatment with sodium benzoate leads to malformation of Zebrafish larvae. *Neurotoxicol. Teratol.*, 2007. Vol. 29. P. 562–569.
46. Weinberg Z. G., Ashbell G., Hen Y., Azrieli A. The effect of applying lactic acid bacteria at ensiling on the aerobic stability of silage. *J. Applied Bacteriol.*, 1993. Vol. 75. P. 512–518.
47. Williams P. E. V., Tait C. A. G., Innes M., Newbold C. J. Effects of the inclusion of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of dairy cows on milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of steers. *J. Anim. Sci.*, 1991. Vol. 69. P. 3016–3026.
48. Woolford M. K., Wilkie A. C. Investigations into the role of specific microorganisms in the aerobic deterioration of maize silage. *J. Agric. Sci.*, 1984. Vol. 102. P. 97–104.
49. Yiannikouris A., Jouany J. Mycotoxins in feed and their fate in animals: a review. *Anim. Res.*, 2002. Vol. 51. P. 81–99.

Received 13 June 2011

Accepted 7 June 2012