

Krystyna Zielińska, Krystyna Stecka, Roman Grzybowski,
Alina Suterska, Antoni Miecznikowski, Marta Kupryś
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie

WPŁYW POZIOMU WYBRANYCH MAKRO- I MIKROELEMENTÓW W KISZONEJ RUNI ŁĄKOWEJ NA DYNAMIKĘ ROZWOJU KULTUR STARTEROWYCH BAKTERII FERMENTACJI MLEKOWEJ

Streszczenie

W celu uzyskania wysokiej jakości kiszonek z runi łąkowej należy zapewnić warunki optymalne do dynamicznego rozwoju bakterii fermentacji mlekowej, dodanych do zielonki w postaci preparatu bakteryjno-mineralno-witaminowego. Oprócz organicznych związków węgla i azotu (węglowodany i białka) konieczna jest zawartość w roślinach przeznaczonych do kiszenia soli mineralnych zawierających makro- i mikroelementy biorące udział w budowie komórek bakterii oraz w procesach enzymatycznych fermentacji mlekowej. Oceniono wpływ działania preparatu na dynamikę rozwoju bakterii fermentacji mlekowej i syntezy kwasu mlekowego oraz hamowanie rozwoju pleśni. Stwierdzono, że w czasie pierwszego tygodnia kiszenia runi łąkowej liczba bakterii wprowadzonych z preparatem j.t.k. g⁻¹ kiszonki wzrasta stukrotnie, a zawartość kwasu mlekowego wynosi w 7 dniu kiszenia około 0,8%, co gwarantuje uzyskanie po 6 tygodniach kiszonki bardzo dobrej jakości, o zawartości kwasu mlekowego ponad 1,8% oraz wysokiej czystości mikrobiologicznej.

Słowa kluczowe: preparat bakteryjno-mineralno-witaminowy, kwas mlekowy, pleśnie, kiszonki

Wstęp

W procesie kiszenia, intensywność namnażania się komórek bakterii fermentacji mlekowej w środowisku zależy od: obecności wody, substancji organicznych, witamin, soli mineralnych oraz odpowiednich dla danego rodzaju bakterii warunków: temperatury, pH i obecności tlenu [Wood, Holzaphfel 1995]. W pożywce MRS przeznaczony do hodowli bakterii fermentacji mlekowej z rodzaju *Lactobacillus spp.* zawarte są makro i mikroelementy w postaci następujących związków: fosforan potasu 0,2%, cytrynian amonu 0,2%, octan sodu 0,5% oraz siarczan magnezu i manganu odpowiednio 0,06% i 0,0014%. Skład soli mineralnych i ich wzajemne proporcje opracowano na podstawie wyników badań dotyczących wymagań pokarmowych

LAB (Lactic Acid Bacteria) [Man i in. 1960; Kandler, Weiss 1986]. Bakterie do budowy protoplazmy, syntezy białek, w tym enzymatycznych, potrzebują związków azotu, wapnia, fosforu, potasu, magnezu, sodu, żelaza, cynku, manganu, siarki, i selenu. Analiza popiołu bakterii wykazała, że składa się on głównie z następujących pierwiastków, oznaczonych jako tlenki: 50% - tlenek fosforu, 30% - tlenki potasu i sodu, 18% - tlenki wapnia i magnezu, a pozostałe 2% to głównie tlenki żelaza i siarki [Kandler, Weiss 1986].

Ruń łąkowa, a zwłaszcza pochodząca z ekologicznych użytków zielonych charakteryzuje się niską zawartością wapnia, fosforu, magnezu, manganu i cynku, zarówno w stosunku do potrzeb pokarmowych namnażającej się populacji kultury starterowej LAB jak i potrzeb zwierząt hodowlanych, dla których stanowi ona podstawową paszę objętościową [Falkowski i in. 1990; Zielińska i in. 2006].

Kultura starterowa preparatu bakteryjnego, który opracowano w Instytucie Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego, z przeznaczeniem do stymulowania procesu kiszenia traw i runi łąkowej, składa się z następujących szczepów bakterii: *Lactobacillus plantarum* KKP/593/p, *Lactobacillus plantarum* KKP/788/p, *Lactobacillus buchneri* KKP 907 i *Lactobacillus brevis* KKP839. Szczepy bakterii wchodzące w skład preparatu charakteryzują się zdolnością do biosyntezy metabolitów o aktywności antibakteryjnej i antypleśniowej [Zielińska i in. 2006].

Dzięki unikalnym cechom użytkowym bakterie te mogą intensywnie się namnażać w środowisku roślin zawierających skrobię i polisacharydy nieskrobiowe, przy niewielkiej zawartości cukrów prostych, ale pod warunkiem zapewnienia im podstawowych wymagań pokarmowych, w tym niezbędnej ilości makro i mikroelementów w zakiszanych surowcach [Falkowski i in. 1990; Zielińska i in. 2006, 2007].

Autorzy prowadzili badania nad wpływem preparatu bakteryjno-mineralno-witaminowego na przebieg procesu kiszenia runi łąkowej w gospodarstwach ekologicznych. Średnia procentowa zawartość makro i mikroelementów w suchej masie runi łąkowej, przeznaczonych do kiszenia, kształtowała się następująco: wapń -1,00, fosfor 0,30, magnez 0,28, mangan i cynk odpowiednio 0,022 i 0,004. Stwierdzono istotne, korzystne zmiany poziomu poszczególnych badanych pierwiastków oraz wzrost zawartości kwasu mlekowego o 30-50%, jak również poprawę jakości i stabilności tlenowej kiszzonek z runi łąkowej [Zielińska i in. 2006].

Ponadto okazało się, że w kiszoncek z dodatkiem dwuskładnikowego preparatu bakteryjno-mineralno-witaminowego nastąpiło zahamowanie rozwoju pleśni, w tym toksynotwórczych, w stosunku do ich zawartości w kiszoncek bez jego dodatku [Zielińska i in. 2007; Zgłoszenie patentowe 2007].

Badania, nad powiązaniem dynamiki wytwarzania kwasu mlekowego, octowego i glikolu propylenowego z tlenową trwałością kiszonek paszowych i ograniczeniem rozwoju mikroorganizmów tlenowych, w tym pleśni toksynotwórczych, prowadzone są w placówkach naukowo-badawczych na świecie, działających na rzecz rozwoju nauk rolniczych [Taylor, Kung 2002]. Nowy kierunek badań w tym zakresie, dotyczy określenia optymalnego okresu fermentacji mlekowej, w którym działanie metabolitów LAB na hamowanie rozwoju bakterii tlenowych i pleśni w procesie kiszenia jest najbardziej efektywne. Synergiczne działanie kwasu mlekowego, kwasu octowego, kwasu propionowego oraz glikolu propylenowego jest prawdopodobnie najbardziej skuteczne w pierwszym okresie kiszenia pasz i dlatego podejmowane są badania związane z przyśpieszeniem rozwoju bakterii i syntezy kwasu mlekowego, między innymi poprzez uzupełnianie zakiszane go materiału roślinnego w wybrane makro- i mikroelementy [Zielińska i in. 2007].

Celem badań była ocena dodatku mieszanki mineralno-witaminowej do kiszonej runi łąkowej na dynamikę syntezy kwasu mlekowego przez przyśpieszenie rozwoju kultury starterowej bakterii.

Założenie badawcze

W pierwszym tygodniu kiszenia runi łąkowej z dodatkiem preparatu bakteryjno-mineralno-witaminowego nastąpi dynamiczny rozwój bakterii fermentacji mlekowej, wzrost zawartości kwasu mlekowego i hamowanie rozwoju bytujących na roślinach zarodników pleśni, co w końcowym etapie kiszenia wpłynie pozytywnie na jakość i czystość mikrobiologiczną kiszonek.

Metody badań

Badania prowadzono w sześciu wybranych gospodarstwach ekologicznych. Kiszonki sporządzano z podsuszonej runi łąkowej pierwszego i drugiego pokosu, bez dodatków i z dodatkiem preparatu bakteryjno-mineralno-witaminowego. Zielonkę przed zwijaniem w baloty spryskiwano roztworem wodnym preparatu bakteryjno-mineralno-witaminowego. Dawka dwuskładnikowego preparatu na tonę zielonki wynosiła 5 g granulatu bakterii o mianie $2 \times 10^9/g$ i 200 g mieszanki mineralno-witaminowej. W skład części mineralno-witaminowej wchodzi: glukonian wapnia, sproszkowany wapień, kreda fosforanowo-magnezowa, beta karoten z marchwi i owoców.

Proces kiszenia runi łąkowej w postaci balotów o masie 400-500 kg wynosił 6 tygodni. W runi łąkowej, kiszonkach kontrolnych bez dodatków i w kiszonkach doświadczalnych z dodatkiem preparatu oznaczano zawartość: suchej masy, wapnia, fosforu, magnezu, manganu, cynku, związków karotenoidowych, kwasu mlekowego, octowego i masłowego, liczbę jednostek tworzących kolonie [j.t.k.] bakterii fermentacji mlekowej i pleśni oraz pH kiszonek, wg następujących metod analitycznych:

- Oznaczenie zawartości suchej masy metodą wagową wg normy (PN-ISO 6496: 2002).
- Oznaczenie zawartości pierwiastków metodą spektrometrii absorpcji atomowej, przy zastosowaniu aparatu Perkin Elmer 1100.
- Oznaczenie karotenoidów metodą kolorymetryczną według normy PN-90/A 75101/12.
- Oznaczenie liczby bakterii fermentacji mlekowej metodą posiewów-płytkową (PN-R 64791: 1994).
- Oznaczenie drożdży i pleśni metodą posiewów - płytkową (PN-ISO 7954: 1999).
- Oznaczenie zawartości kwasów L i D mlekowego, octowego i hydroksymasłowego metodami enzymatycznymi, przy użyciu testów-UV Boehringer Mannheim.
- Oznaczenie pH metodą potencjometryczną.

Wyniki badań

Pod wpływem dodatku do przeznaczanej do kiszenia runi łąkowej, preparatu bakteryjno-mineralno-witaminowego, w kiszonkach wzrosła zawartość makro- i mikroelementów, niezbędnych do rozwoju kultury starterowej bakterii fermentacji mlekowej. Stwierdzono, że w suchej masie kiszonki wyższa była zawartość wapnia o 15%, fosforu o 38%, magnezu o 29,5%, manganu o 29%, cynku o 28,5% i związków karotenoidowych o około 15%, w stosunku do ich zawartości w suchej masie runi łąkowej.

Wyniki badań z dwóch lat doświadczeń prowadzonych w 6 gospodarstwach, dotyczące zawartości makro- i mikroelementów oraz karotenoidów w runi łąkowej i w kiszonkach sporządzonych z dodatkiem preparatu bakteryjno-mineralno-witaminowego przedstawiono w tabeli 1 i na rysunkach 1 i 2.

Badano dynamikę rozwoju bakterii fermentacji mlekowej i zmiany zawartości kwasu mlekowego w czasie pierwszego tygodnia i po upływie 6 tygodni kiszenia runi łąkowej, bez i z dodatkiem preparatu bakteryjno-mineralno-witaminowego. W kolejnym etapie pracy określono wpływ działania preparatu bakteryjno-mineralno-witaminowego, w końcowym efekcie kiszenia runi łąkowej, na ograniczanie liczby j.t.k pleśni: g^{-1} kiszonki, czyli poprawę ich czystości mikrobiologicznej. Wyniki przedstawiono w tabeli 2 i na rysunkach 3 i 4.

Ruń łąkowa przeznaczona do kiszenia zawierała średnio 2×10^3 j.t.k./g bakterii kwaszających, po dodatku preparatu liczba bakterii fermentacji mlekowej na starcie była 10.krotnie wyższa. W procesie kiszenia po upływie czterech i siedmiu dni liczba bakterii w kiszonkach bez dodatku preparatu wzrosła odpowiednio do wartości 8×10^4 j.t.k. g^{-1} i 3×10^5 j.t.k. g^{-1} kiszonki. Pod wpływem działania preparatu w czasie pierwszego tygodnia kiszenia nastąpiło przyśpieszenie procesu namnażania się bakterii fermentacji mlekowej, w 7 dniu kiszenia ich liczba wzrosła do wartości 2×10^6 j.t.k. g^{-1} , w sto-

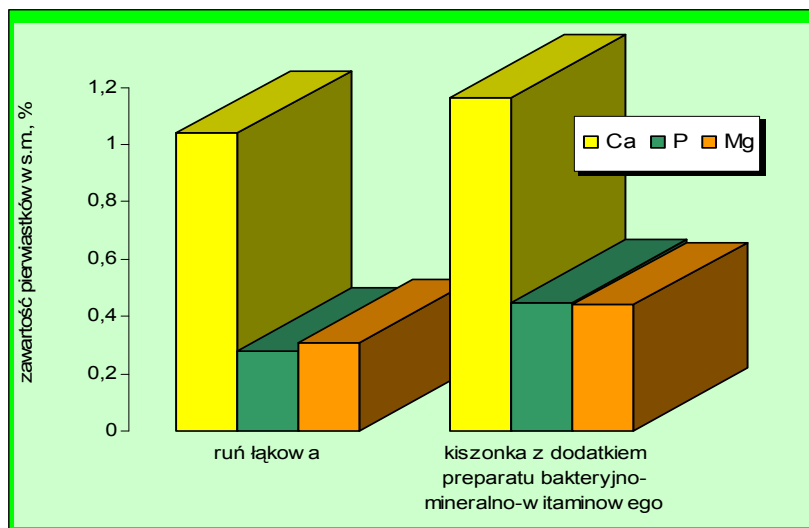
sunku do wartości $3 \times 10^5 \text{ g}^{-1}$ kiszonki kontrolnej, co spowodowało również 2-krotny wzrost zawartości kwasu mlekowego do 0,8% w stosunku do jego zawartości w kiszonkach bez dodatku preparatu.

Tabela 1. Wpływ preparatu bakteryjno-mineralno-witaminowego na poziom makro i mikroelementów w kiszonkach z runi łąkowej

Table 1. Effect of bacterial-mineral-vitamin preparation on the level of macro- and microelements in silages produced from meadow sward

Makro- i mikroelementy	Zawartość w suchej masie runi łąkowej w latach		Zawartość w suchej masie kiszonki w latach	
	2005	2006	2005	2006
Ca, %	1,06	1,02	1,14	1,19
P, %	0,25	0,31	0,42	0,48
Mg, %	0,29	0,33	0,42	0,46
Mn, mg/kg	97,00	91,00	121,00	117,50
Zn, mg/kg	34,70	37,00	46,00	51,00
Związki karotenoidowe, mg/kg	13,00	12,50	14,00	14,80

Źródło: Obliczenia własne autorów

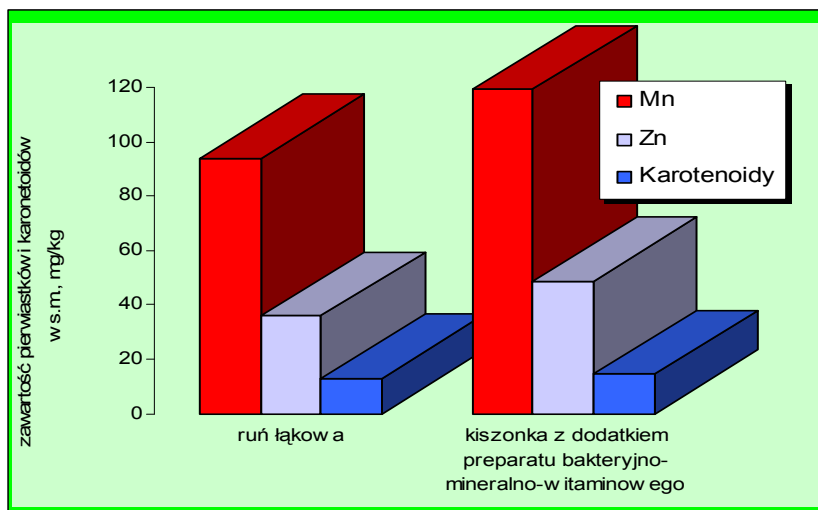


Rys. 1. Średnia zawartość wapnia, fosforu i magnezu w runi łąkowej i kiszonkach

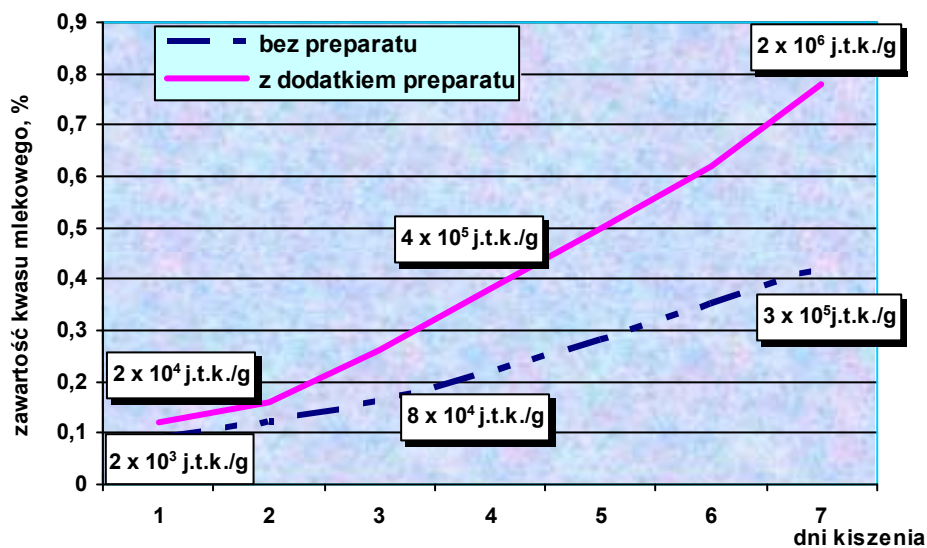
Fig.1 . Mean contents of calcium, phosphorus and magnesium in meadow grasses and in silage

Po zakończeniu kiszenia, czyli po upływie 6 tygodni, oznaczano w kiszonkach bez lub z dodatkiem preparatu; wartość pH, procentową zawartość kwasów - mlekowego, octowego i masłowego oraz w runi łąkowej i w kiszonkach oznaczano liczbę bakterii fermentacji mlekowej [LAB] i liczbę pleśni. Wyniki przedstawiono w tabeli 2, natomiast zależność między wyni-

kami średnimi ze wszystkich gospodarstw, dotyczącymi liczby LAB i pleśni w runi łąkowej i w kiszonkach oraz poziomu kwasu mlekowego w kiszonkach pokazano na rysunku 4.



Rys. 2. Średnia zawartość manganu, cynku i karotenoidów w runi łąkowej i kiszonkach
Fig. 2. Mean contents of manganese, zinc and carotenoids in meadow grasses and in silage



Obok krzywych zmian zawartości kwasu mlekowego w kiszonce podano oznaczoną liczbę bakterii fermentacji mlekowej w pierwszym, czwartym i siódmym dniu kiszenia

Rys. 3. Porównanie dynamiki wytwarzania kwasu mlekowego w pierwszym tygodniu kiszenia runi łąkowej bez i z dodatkiem preparatu-bakteryjno-mineralno-witaminowego

Fig. 3. Comparison of lactic acid production dynamics during first week of ensiling meadow grasses without and with addition of bacterial-mineral-vitamin preparation

Wpływ poziomu wybranych...

Tabela 2. Ocena jakości kiszonek sporządzonych bez i z dodatkiem preparatu bakteryjno-mineralno-witaminowego w gospodarstwach ekologicznych
Table 2. Evaluation of the quality of silages, prepared without and with the addition of bacterial-mineral-vitamin preparation in organic farms

Kiszonka	Sucha masa %	pH	Zawartość kwasów organicznych (%)			Liczba j.t.k. LAB/g kiszonki	Liczba j.t.k. pleśni/g kiszonki
			mlekowy	octowy	masłowy		
ruń łąkowa	47,8	-	-	-	-	3×10^3	2×10^5
kontrolna	45,8	5,0	0,98	0,25	0,11	4×10^5	2×10^3
doświadczalna	46,9	4,8	1,86	0,34	brak	3×10^7	8×10^1
ruń łąkowa	46,5	-	-	-	-	8×10^2	3×10^5
kontrolna	45,0	5,2	0,95	0,29	0,05	9×10^5	6×10^3
doświadczalna	45,5	4,7	1,79	0,42	brak	2×10^7	2×10^2
ruń łąkowa	51,4	-	-	-	-	1×10^3	1×10^5
kontrolna	50,2	5,3	0,99	0,21	0,10	3×10^5	2×10^4
doświadczalna	51,9	4,7	1,84	0,48	brak	1×10^7	1×10^2
ruń łąkowa	50,2	-	-	-	-	9×10^2	3×10^5
kontrolna	47,2	5,4	0,96	0,22	0,12	1×10^6	7×10^3
doświadczalna	48,8	4,6	1,72	0,42	brak	3×10^7	3×10^2
ruń łąkowa	52,7	-	-	-	-	7×10^2	1×10^5
kontrolna	50,8	5,4	0,94	0,25	0,09	8×10^5	1×10^4
doświadczalna	50,2	4,8	1,86	0,36	brak	9×10^6	2×10^2
ruń łąkowa	47,2	-	-	-	-	1×10^3	6×10^5
kontrolna	47,7	5,0	0,88	0,31	0,03	3×10^5	6×10^3
doświadczalna	48,6	4,6	1,69	0,39	brak	2×10^7	4×10^1

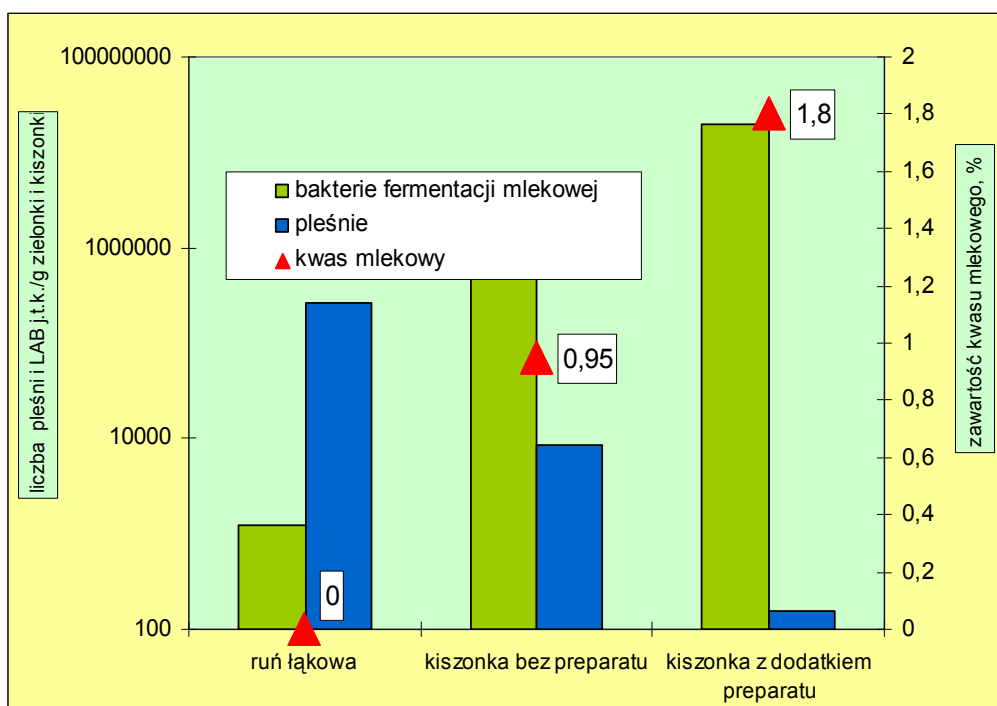
Źródło: Obliczenia własne autorów

W kiszonkach bez dodatku preparatu liczba bakterii fermentacji mlekowej wzrosła w kolejnych tygodniach kiszenia 2.krotnie, natomiast pod wpływem działania preparatu - 10.krotnie do wartości średniej 2×10^7 j.t.k. g^{-1} kiszonki. Zawartość kwasu mlekowego w gotowych kiszonkach bez dodatku preparatu wynosiła 0,95%, a w kiszonkach z dodatkiem preparatu wzrosła do wartości 1,8%.

Kiszonki doświadczalne z dodatkiem badanego preparatu charakteryzowały się wysoką jakością, w tym organoleptyczną, brakiem kwasu masłowego oraz niższą liczbą pleśni $1,5 \times 10^2$ j.t.k. \cdot g $^{-1}$, w stosunku do kiszonek kontrolnych, które zawierały średnio $8,5 \times 10^3$ j.t.k. \cdot g $^{-1}$ kiszonki. Zawartość pleśni w runi łąkowej, oznaczana przed sporządzaniem kiszonek, była bardzo wysoka i wynosiła średnio w gospodarstwach doświadczalnych $2,7 \times 10^5$ j.t.k. \cdot g $^{-1}$ zielonki podsuszanej do zawartości suchej masy 45-50%.

Uzyskane wyniki potwierdzają wpływ wybranych szczepów z gatunków: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* i *Lactobacillus buchneri* do hamowania rozwoju pleśni w tym z rodzaju *Aspergillus*, w procesie kiszenia pasz [Gourama, Bullerman 1995].

Sformułowane założenie badawcze zostało potwierdzone.



Rys. 4. Wpływ preparatu bakteryjno-mineralno-witaminowego na rozwój bakterii fermentacji mlekowej, zawartość kwasu mlekowego i hamowanie rozwoju pleśni w kiszonkach

Fig. 4. Effect of bacterial-mineral-vitamin preparation on development of lactic acid bacteria, lactic acid content and inhibition of mould development in silages

Wnioski

1. W czasie pierwszego tygodnia kiszenia, pod wpływem działania preparatu bakteryjno-mineralno-witaminowego nastąpiło przyspieszenie dynamiki rozwoju bakterii fermentacji mlekowej, ich liczba w 7 dniu kiszenia wzrosła do wartości 2×10^6 j.t.k.g⁻¹ kiszonki, co spowodowało również 2.krotny wzrost zawartości kwasu mlekowego w stosunku do kiszonek kontrolnych, bez dodatku preparatu.
2. Szybkie opanowanie środowiska kiszonej zielonki przez szczepy bakterii fermentacji mlekowej było możliwe dzięki wprowadzonym dodatkowo z preparatem makro- i mikroelementów, niezbędnych do rozwoju bakterii, co spowodowało przyspieszenie syntezy kwasu mlekowego, zahamowanie fermentacji masłowej oraz hamowanie rozwoju pleśni, a w końcowym efekcie wzrost jakości i czystości mikrobiologicznej kiszonek.

Bibliografia

- Falkowski M., Kukuła I., Kozłowski S. 1990. Właściwości chemiczne roślin. Skrypt Akademii Rolniczej, Poznań
- Gourama H., Bullerman L.B. 1995. Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus* species. J. Food Protect., Nr 58, 11, s. 1249-1256
- Kandler O., Weiss N., 1986; Genus *Lactobacillus*. 1991. Bergey's manual of systematic bacteriology, vol.2, The Williams & Wilkins co., Baltimore, Nr 212, s. 1209
- Man J.,C., Rogosa M., Sharpe M.,E. 1960. A medium for the cultivation of *Lactobacilli*; J. Appl. Bact., T.23, Nr 1, s.130-135
- Taylor C. C., Kung L., Jr. 2002. The effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the fermentation and aerobic stability of high moisture corn in laboratory silos. J. Dairy Sci., Nr 85, s.1526-1532
- Wood J. B. B., Holzaphfel W. H. 1995. The Genera of Lactic Acid Bacteria, Vol 2, Blackie Academic Profesional, Glasgow
- Zgłoszenie patentowe P. 382 878. 2007. Bakteryjno-mineralno-witaminowy preparat ograniczający rozwój pleśni w procesie kiszenia pasz i sposób jego wytwarzania. IBPRS, Warszawa
- Zielińska K. J., Stecka K. M., Suterska A. M., Miecznikowski A. H. 2006. Ekologiczna metoda kiszenia pasz objętościowych. J. of Research and Appl. in Agric. Engin., Vol. 51(2), s. 219-223
- Zielińska K.J., Stecka K. M., Suterska A. M., Miecznikowski A. H. 2007. Wpływ ekologicznej technologii kiszenia runi łąkowej na hamowanie rozwoju pleśni wytwarzających mikotoksyny. Problemy Inżynierii Rolniczej, Nr 1(55), s. 61-70