

Sylwester BOROWSKI¹, Edmund DULCET¹, Sławomir ŻAK²

e-mail: sylwa@utp.edu.pl

¹Zakład Techniki Rolniczej, Wydział Inżynierii Mechanicznej, UTP Bydgoszcz²Katedra Chemii i Ochrony Środowiska, Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej, UTP Bydgoszcz

Metoda chemicznego oznaczania materiałów biologicznie czynnych w badaniach nad materiałami roślinnymi

Wstęp

Badania nad produkcją pasz, a zwłaszcza pasz objętościowych powinny odpowiedzieć na pytanie, czy uzyskany produkt jest dobrej jakości oraz jakie elementy zastosowanego procesu technologicznego mają wpływ na tę jakość. W prowadzonych w *Zakładzie Techniki Rolniczej* pracach nad jakością wilgotnego siana zbieranego z użyciem preparatu konserwującego biologicznie czynnego jakość uzyskanej paszy określano poprzez jej badanie w założonym czasie po zbiorze. Stosowany preparat konserwujący *Inoculant 1155* w swoim składzie zawiera liofilizat bakterii *Bacillus spp.*, które po dodaniu do zbieranego siana namnażają się i rozprzestrzeniają w zebranej masie. Do swoich potrzeb bytowych wykorzystują wilgoć zawartą w sianie, a po jej wykorzystaniu (osuszeniu siana) obumierają. Jest więc to naturalna i w pełni bezpieczna metoda konserwacji siana, pozwalająca na zbiór siana przy jego zwiększonej wilgotności, w czasie gdy nie zachodzi jeszcze intensywne odkruszanie się liści. Jednocześnie możliwe jest zbieranie wilgotnego siana w formie sprasowanej, a jego dosuszanie nie wymaga stosowania aktywnej wentylacji. Jest to energooszczędna metoda. Jednak badanie ilości bakterii w poszczególnych miejscach silosu kilkanaście dni od zbioru nie daje pełnej informacji o rozmieszczeniu preparatu natychmiast po zbiorze, co w przypadku stosowania preparatów chemicznych jest bardzo istotną informacją [1, 2].

Warunkiem prawidłowej aplikacji preparatu konserwującego jest dostarczenie jego ściśle określonej ilości do zbieranej paszy w taki sposób, by uzyskać jego równomierne wymieszanie. W wyniku nierównomiernego rozprowadzenia preparatu w zbieranym wilgotnym sianie, może dochodzić do pogorszenia jakości siana, a pasza pochodząca z miejsc o zwiększonym stężeniu preparatu konserwującego może działać niekorzystnie na zdrowie zwierząt [3, 4]. W czasie dodawania preparatu konserwującego w trakcie zbioru zawsze występują jego straty. Oprócz możliwego toksycznego wpływu na środowisko, straty wpływają także na zwiększenie kosztów konserwacji. Stosowanie chemicznych preparatów konserwujących może niekorzystnie wpływać na odrost roślin, co w efekcie może spowodować spadek plonu. [2, 3].

Analiza literaturowa zagadnień dotyczących zbioru pasz z użyciem dodatków wykazała, że w niektórych badaniach pojawiał się problem oceny równomierności wymieszania preparatu ze zbieranym materiałem. Ocena przeprowadzana na podstawie analizy pobieranych próbek poprzez:

- pomiary pH lub ilościowe oznaczanie preparatu zastosowanego w badaniach [5, 6],
- analizę jakości uzyskanej paszy [5, 7].

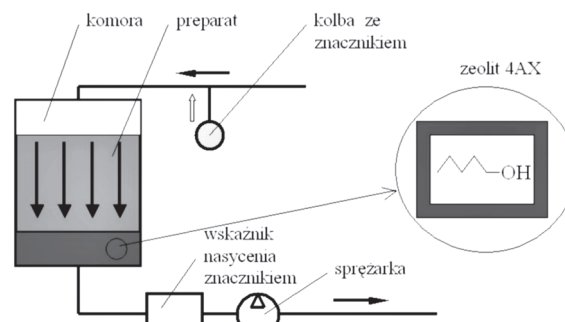
Innymi metodami służącymi do oceny równomierności wymieszania preparatu ze zbieranym materiałem są analiza fluorescencyjna oraz napromieniowywanie za pomocą izotopów. Jednak metody te są stosunkowo trudne do stosowania, a pasza pozostająca po tak prowadzonych badaniach może nie nadawać się do skarmiania [8, 9].

Celem niniejszej pracy jest prezentacja metody znacznikowania preparatów biologicznie czynnych za pomocą n-heksanu oraz uzyskanych wyników badań.

Materiał i metody

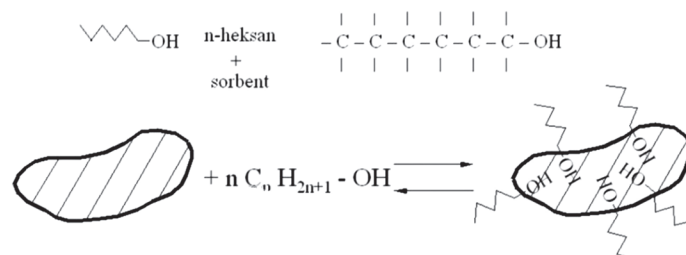
W badaniach użyto preparat stały granulowany *Inoculant 1155* firmy *Pioneer* o następujących właściwościach fizycznych: masa usypowa 1040 kg·m⁻³, wilgotność względna 2,5%, średnia średnica granulek 0,87 mm. Preparat aplikowano w ilości 0,1% (1 kg na tonę wilgotnego siana). Preparat zawiera liofilizat naturalnych bakterii *Bacillus spp.* oraz węglan wapnia. Gwarantowana ilość żywych bakterii to 1·10⁸ cfu·g⁻¹.

Dla potrzeb doświadczenia preparat mikrobiologiczny *Inoculant 1155* znacznikowano metodą kontaktową zapewniającą dużą wydajność (Rys. 1). Opary markera przepuszczano przez złożę preparatu do momentu nasycenia wskaźnika [10].



Rys. 1. Znacznikowanie preparatu *Inoculant* za pomocą n-heksanu przy użyciu metody kontaktowej

Zastosowany marker tworzy z preparatem wiązanie fizyczne (Rys. 2), które pod wpływem ekstrahenta rozpada się.



Cofanie procesu pod wpływem ekstrahenta

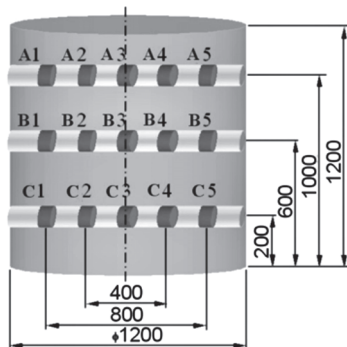
Rys. 2. Schemat połączeń cząsteczek markera z preparatem mikrobiologicznym

W celu uzyskania powtarzalnych wyników opracowano algorytm postępowania. Pobraną próbkę po oddzieleniu zanieczyszczeń grubych poddaje się suszeniu do stałej masy celem oznaczenia zawartości wody. Następnie wysuszoną, homogenizuje się celem rozdrobnienia do poziomu poniżej 150,0 μm. Rozdrobnioną próbkę poddaje się ekstrakcji (ekstrahent – 150,0 ml) w układzie ciecz (aceton) – ciało stałe w temperaturze 20±1,0°C z wykorzystaniem wstrząsarki przez 24 godziny w szczelnie zamkniętych kolbach stożkowych o pojemności 250,0 ml. Po odwirowaniu części stałych na wirówce, z dekantacji należy pobrać mikrostrzykawką 2,0–3,0 μl próby acetonowej celem oznaczenia analitu za pomocą chromatografu gazowego oraz spektrometru masowego.

Do badań wykorzystano chromatograf gazowy *Hewlett Packard 5890 series II* (kolumna HP-1, o długości – 30,0 m, średnicy φ – 0,53

mm, faza *Hypersil ODS Shandon*) z detektorem AED i ECD oraz spektrometr masowy (MS 5972 series *Mass Selective Detektor* – kolumna: *Pona* o długości 25,0 m, średnicy φ – 0,33 mm). Analizę wykonano w trybie programowania temperaturowego: 20–120°C/10 min., 120–180°C/20 min. i 180–260°C/20 min.

Próbki pobierano z 15 różnych miejsc beli według schematu przedstawionego na rys. 3.



Rys. 3. Schemat miejsc pobierania próbek siana z beli

Równomierność wymieszania preparatu granulowanego *Inoculant* 1155 z sianem charakteryzowano za pomocą wskaźnika nierównomierności wymieszania (współczynnik zmienności):

$$K = \frac{\varphi}{x_{sr}} 100\% \quad (1)$$

gdzie:

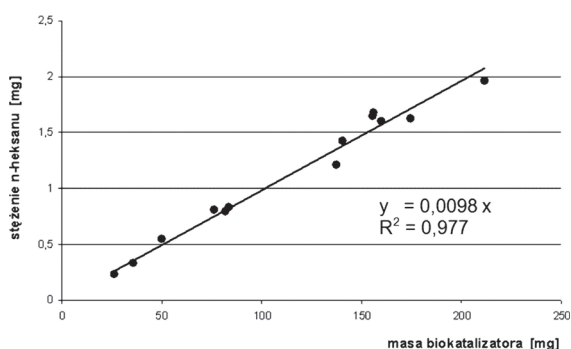
K – wskaźnik nierównomierności wymieszania (współczynnik zmienności) dla zawartości n-heksanu, [%],

φ – odchylenie standardowe, [mg·100g⁻¹],

x_{sr} – średnia arytmetyczna zawartość, [mg·100 g⁻¹].

Walidacja opracowanej metody

W celu weryfikacji opracowanej metody dokonano badań wstępnych. Zgodnie z przyjętym algorytmem dokonano ilościowego oznaczenia metodą wzorca zewnętrznego. Poziom odzysku n-heksanu uzyskany w badaniach wynosił 89,1–94,6% przy czasie retencji tego alkoholu T_R – 11,2–11,4 min. Uzyskane wyniki przedstawiono na rys. 4.



Rys. 4. Zależność stężenia n-heksanu oznaczonego w badaniach wstępnych

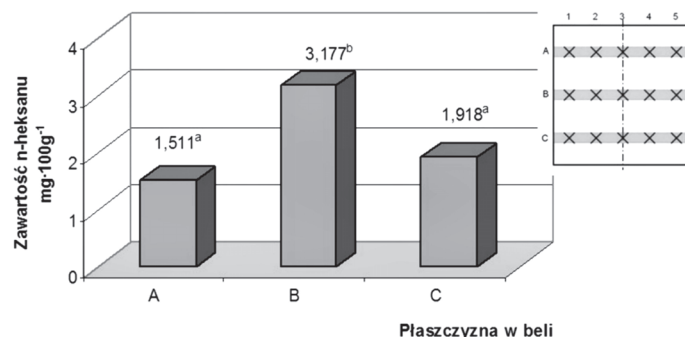
W wyniku przeprowadzonej analizy wyznaczono równanie regresji (2) przy poziomie istotności $p = 0,05$. Jest to funkcja liniowa i charakteryzuje się wysokim współczynnikiem determinacji $R^2 = 0,977$, co świadczy o dobrym wyznaczeniu zależności funkcyjnych.

$$y = 0,0098x \quad (2)$$

Wyniki badań

W oparciu o uzyskane w doświadczeniach polowych dane wykonano histogramy rozkładu zawartości dla poszczególnych płaszczyzn beli.

Przykładowy histogram pokazano na rys. 5. Różnice istotne statystycznie przy *Najniższej Istotnej Różnicy* $NIR_{0,05} = 0,749$ wystąpiły pomiędzy płaszczyznami poziomymi A i C. Płaszczyzna pozioma B różniła się od pozostałych i w miejscach znajdujących się tam stwierdzono średnio największą zawartość n-heksanu.



Rys. 5. Histogram zawartości n-heksanu w próbkach siana dla płaszczyzn pomiarowych poziomych A–C (wartość średnia). Wartości oznaczone literami różnią się istotnie statystycznie ($p \leq 0,05$)

Wskazuje to na jednostkowe różnice w ilości podawanego preparatu, oraz prawdopodobny wpływ aplikatora (wskaźnik nierównomierności aplikatora *Gandy Jumbo* $\pm 2\%$).

Obliczony wskaźnik nierównomierności (współczynnik zmienności) rozmieszczenia n-heksanu wyniósł $K = 61,1\%$.

Podsumowanie

Zastosowanie nowej metody znacznikowania preparatu mikrobiologicznego za pomocą h-heksanu umożliwiło uzyskanie informacji o rozmieszczeniu preparatu mikrobiologicznego bezpośrednio po zbiorze. Metoda ta pozwala na prowadzenie doświadczenia w warunkach identycznych z warunkami występującymi w praktyce rolniczej.

Zastosowanie markera pozwala na wykorzystanie szybkich metod analizy przy pomocy chromatografu gazowego i spektrometru masowego. Jest to metoda przyjazna dla środowiska, a pozostała po pobraniu próbek pasza jest bezpieczna dla zwierząt.

Zbiór wilgotnego siana z użyciem preparatów konserwujących podnosi jakość uzyskanej paszy oraz zmniejsza wydatki energetyczne na dosuszanie.

LITERATURA

- [1] G. Bernes, K. Persson Waller, S. K. Jensen: Hay and silage as vitamin sources in organic sheep production. [in:] A. Hopkins, T. Gustafson, J. Bertilsson, G. Dalin, N. Nilsdotter-Linde, E. Spörndly: Biodiversity and Animal Feed. Future Challenges for Grassland Production. Proc. of the 22nd General Meeting of the European Grassland Federation, June 2008, Uppsala, 565.
- [2] E. Dulcet, J. Kaszkowiak, S. Borowski, J. Mikolajczak: *Biostystems Engineering* **95**, nr 3, 379 (2006).
- [3] E. Dulcet, J. Mikolajczak, T. Olszewski: Technika zastosowania konserwantów przy zbiorze wilgotnego siana. Wyd. Uczelniane ATR w Bydgoszczy, 2002.
- [4] C. A. Rotz: *Advances in Dairy Technology* **15**, 227 (2003).
- [5] E. Dulcet: Nowoczesne techniki zbioru zielonek i metody ich zakiszania. Wyd. ATR w Bydgoszczy 2001.
- [6] W. Wrzos: Sprawozdanie z badań kwalifikacyjnych dozownika do konserwacji zielonek „Apol-2/100”. IBMER XXII/720, Warszawa, 1980.
- [7] H. Maškova, V. Holubowa, M. Luňáček: *Zemědělska Technika* 5/6, 259, 1991.
- [8] H. Koch, M. Spiels: *Deutsche Pflanzenschutz*. **37**, 187 (1985).
- [9] K. M. Wittenberg: Microbial and nutritive changes in forage during harvest and storage as hay. Proc. XVIII international Grassland Congress, 265, Canada, June 1997.
- [10] K. Kondo, X.P. Lee, T. Kumazawa, K. Sato, K. Watanabe-Suzuki, H. Seno, O. Suzuki: *J. AOAC Int.*, **84**, nr 1, 19 (2001).