

Jakość higieniczna kiszonki z kukurydzy zakiszanej z dodatkiem biologicznym lub chemicznym

JAN GRAJEWSKI, ANDRZEJ POTKAŃSKI*, KATARZYNA RACZKOWSKA-WERWINSKA*,
MAGDALENA TWARUŻEK, BEATA MIKLASZEWSKA, MONIKA GRABOWSKA,
AGNIESZKA GUBAŁA*, MAREK SELWET**

Instytut Biologii i Ochrony Środowiska UKW, ul. Chodkiewicza 30, 85-064 Bydgoszcz

*Katedra Żywienia Zwierząt i Gospodarki Paszowej Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt AR, ul. Wołyńska 33, 60-637 Poznań

**Katedra Mikrobiologii Rolnej Wydziału Rolniczego AR, ul. Szydłowska 50, 60-656 Poznań

Grajewski J., Potkański A., Raczkowska-Werwinska K., Twarużek M., Miklaszewska B.,
Grabowska M., Gubała A., Selwet M.

Hygienic quality of corn silage with a biological and chemical additive

Summary

The aim of the study was the biological, chemical and microbiological evaluation of row silage maize. Changes in the amount of DON and ZON during the fermentation process of the maize and then after a week-long oxygen exposure of the silage (stability evaluation) were evaluated. Samples for the study were taken from maize type F70 (Flint type grain from Austria) which had been ensilaged after harvesting in the middle of September 2003 in the following ways (5 microsilos each). The first treatment: 1 – control – maize; 2 – maize + 0.25% KemiSile 2000; 3 – maize + 0.2 Lactacel L – enzymatic preparation (*Lactobacillus plantarum* 10⁸ CFUg⁻¹ + enzymes). After 12 weeks of fermentation the quality of the silage, microbiological analysis and the presence of *Fusarium* toxins were evaluated. Additionally, the same analysis was carried out on the silage which had undergone the 7-day oxygen exposure. The level of both mycotoxins and moulds increased again (especially *Aspergillus*, *Penicillium* and *Mucor* genera) during oxygen exposure of the silage. KemiSile 2000 additive had a positive influence on the quality and stability of the silage.

Keywords: corn silage

Jakość kiszzonek zależy – z jednej strony – od jakości zakiszanej masy, z drugiej – od techniki zakiszania i sposobu skarmiania. Kiszonka z kukurydzy jest najczęściej stosowaną w chowie bydła paszą objętościową o charakterze energetycznym. Po otwarciu zbiornika rozpoczyna się proces tlenowego rozkładu kiszonki i zawartych w niej składników pokarmowych (białko ogólne, cukry proste, kwasy organiczne). Składniki te stanowią doskonałą pożywkę dla rozwoju drożdży i pleśni (grzybów z rodzaju *Aspergillus*, *Penicillium*, *Monascus*, *Mucor* i in.). Na zakiszanej kukurydzy stwierdza się obecność grzybów, przede wszystkim z rodzaju *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, które mogą tworzyć m.in. aflatoksyny (AFLA), ochratoksynę A (OTA), trichoteceny (T2 toksynę, HT-2 toksynę, deoksyniwalenol (DON), diacetoksyscirpenol (DAS), a także zearalenon (ZON) (2). Niewłaściwa technika zakiszania surowca oraz wybierania kiszzonek umożliwia między innymi wzrost grzybów *Penicillium roqueforti* oraz *Monascus ruber*, co z kolei prowadzić może do wystąpienia w kiszonkach dodatkowo wtórnych metabolitów, takich jak: roquefortyna C, kwas mikofenolowy, monakolina K czy cytrynina.

Z uwagi na możliwość przechodzenia mikotoksyn do produktów pochodzenia zwierzęcego (carry-over), zwłaszcza mleka i jego przetworów, skarmianie pasz zawierających te związki może stanowić zagrożenie dla zdrowia konsumentów (6).

Stosowanie dodatków kiszonkarskich zawierających krótkołańcuchowe kwasy organiczne i ich estry lub sole, a także mieszaniny tych związków korzystnie wpływa na skład chemiczny kiszzonek. Wyniki badań nad wpływem tych preparatów na liczebność drożdży i pleśni są bardzo zróżnicowane. Większość autorów (7, 8, 11, 12) uważa, że redukuje one ich liczbę, ale istnieją sugestie, że dodatek preparatów chemicznych, zawierających kwasy organiczne, może powodować intensywniejszy wzrost grzybów lub wzmożone wytwarzanie mikotoksyn, jako reakcję pleśni na stres środowiskowy (4, 15, 19, 20). Zjawisko takie obserwowano przy suboptymalnym udziale kwasu mrówkowego, podczas zakiszania wilgotnego ziarna zbóż. Prawidłowy proces kiszenia pasz może zapobiec powstawaniu mikotoksyn, ale w pełni nie unieczynnia wytworzonych już wcześniej metabolitów w warunkach polowych (1).

Celem badań było określenie:

- jakości chemicznej i mikrobiologicznej zakiszanej kukurydzy z dodatkiem preparatu mikrobiologicznego lub chemicznego,
- stabilności tlenowej kiszonek z kukurydzy,
- poziomu mikotoksyn pleśni polowych i magazynowych podczas procesu fermentacji i po tygodniowej ekspozycji tlenowej.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na kukurydzy odmiany F70 (ziarno typu flint z Austrii), którą po rozdrobnieniu zakiszono w mikrosilosach o pojemności 4 dm³ w trzech wariantach. Wariant: 1 – grupa kontrolna – kukurydza; 2 – kukurydza + 0,25% preparatu Kemisile 2000 (55% kwasu mrówkowego, 9% kwasu propionowego, 5% kwasu benzoowego, 24% mrówczanu amonu, 7% estru kwasu benzoowego); 3 – kukurydza + 0,2% preparatu bakteryjno-enzymatycznego Lactacel L (*Lactobacillus plantarum*, endo-1,4-beta-glukanaza, ksylanaza, glukoamylaza).

W trakcie zakiszania surowca określono sumę aflatoksyn, ochratoksynę A, deoksynivalenol i zearalenon. Po 12 tygodniach fermentacji dokonano oceny składu chemicznego, jakości kiszonek, analizy mikrobiologicznej i udziału toksyn – metabolitów pleśni *Fusarium* (DON i ZON). Następnie takie same analizy wykonano w kiszonkach poddanych 7-dniowej ekspozycji tlenowej. Badania mikrobiologiczne obejmowały oznaczenie ogólnej liczby grzybów pleśniowych, drożdży, bakterii fermentacji mlekowej, bakterii *Clostridium* i bakterii *E. coli*. Analizy mikotoksyn (AFLA, OTA, ZON) dokonano metodą HPLC (Merck – Hitachi) z detekcją fluorescencyjną, a DON oznaczono metodą immunoenzymatyczną ELISA. Próbkę po ekstrakcji oczyszczono na kolumnkach powinowactwa immunologicznego.

Dla oznaczenia aflatoksyn zastosowano system derywatywacji z KobraCell. Kwasy organiczne analizowano metodą chromatografii cieczowej firmy Hewlett – Packard HP 1050 z detectorem UV z zastosowaniem kolumny Supelcogel C – 610 H (Supelco).

Tab. 1. Skład chemiczny, mikrobiologiczny i mikotoksykologiczny surowca oraz kiszonek z kukurydzy

Parametry	Surowiec zakiszany	Kiszonka					
		Kontrola		Kemisile 2000		Lactacel L	
		po otwarciu	po stabilności	po otwarciu	po stabilności	po otwarciu	po stabilności
DON (ppb)	7690	454	679	307,5	425,0	662,5	724,5
ZON (ppb)	< 5	< 5	< 5	22,3	17,7	23,5	36,7
Pleśnie (jtk/g)	1,1 × 10 ⁷	1,0 × 10 ²	5,6 × 10 ⁵	1,3 × 10 ³	5,0 × 10 ⁷	2,1 × 10 ²	1,7 × 10 ⁷
Drożdże (jtk/g)	1,1 × 10 ⁸	1,1 × 10 ⁴	6,3 × 10 ⁸	1,0 × 10 ³	2,5 × 10 ⁸	6,2 × 10 ⁴	7,9 × 10 ⁸
LAB (jtk/g)	2,5 × 10 ⁸	2,4 × 10 ⁸	2,1 × 10 ⁸	1,9 × 10 ⁸	1,7 × 10 ⁸	2,6 × 10 ⁸	2,2 × 10 ⁸
<i>Clostridia</i> (jtk/g)	5,4 × 10 ⁶	1,6 × 10 ⁶	9,7 × 10 ⁵	7,6 × 10 ⁵	1,9 × 10 ⁵	1,3 × 10 ⁶	3,5 × 10 ⁵
<i>E. coli</i> (jtk/g)	6,8 × 10 ⁸	1,0 × 10 ⁵	9,3 × 10 ⁴	7,4 × 10 ⁴	5,5 × 10 ⁴	9,3 × 10 ⁴	6,4 × 10 ⁴
Sucha masa (g/kg)	410,00	466,79	460,92	460,22	469,82	443,02	467,70
Białko surowe (g/kg sm)	68,10	66,32	80,12	76,60	78,92	75,80	77,94
Włókno surowe (g/kg sm)	251,40	124,70	144,10	140,40	134,30	143,70	137,40
ADF (g/kg sm)	n.b.	160,70	150,10	162,40	142,50	163,60	164,60
NDF (g/kg sm)	n.b.	352,60	338,40	386,10	316,70	378,90	330,40
NH ₃ N (g/kg sm)	n.b.	0,50	0,30	0,60	0,40	0,60	0,30
Etanol g/kg	n.b.	3,86	1,86	4,98	0,96	6,66	1,80
Cukry rozp. w wodzie (g/kg sm)	n.b.	31,96	27,08	50,88	22,22	47,70	17,94
Kwas octowy (g/kg sm)	n.b.	13,90	2,30	12,40	3,70	19,20	3,20
Kwas mlekowy (g/kg sm)	n.b.	51,33	4,91	52,95	27,22	70,43	10,24
Kwas mrówkowy (g/kg sm)	n.b.	0,40	0,30	0,20	0,30	0,50	0,30
Kwas propionowy (g/kg sm)	n.b.	0,70	1,20	1,20	1,70	1,20	1,20
Wartość pH	n.b.	3,88	6,09	3,88	6,03	3,79	6,42

Objaśnienie: n.b. – nie badano

Analiza mikrobiologiczna obejmowała oznaczenie liczby bakterii fermentacji mlekowej, bakterii z grupy *Coli*, rodzaju *Clostridium*, drożdży i grzybów pleśniowych w świeżym materiale roślinnym przeznaczonym do konserwacji oraz w kiszonce. Liczbę drobnoustrojów oznaczono wykonując posiew głębinowy metodą płytek lanych z kolejnych rozcieńczeń. Wylewano 1 ml zawiesiny na płytki Petriego i zalewano 20 ml podłoża hodowlanego.

Do hodowli zastosowano następujące podłoża: bakterie fermentacji mlekowej ATP Agar firmy Merck (4) *Clostridium* TSC® Agar firmy Merck (13), bakterie z grupy *coli* Chromocult® Coliform Agar firmy Merck (11), grzyby pleśniowe podłoża agarowe peptonowo-glukozowe z różem bengalskim wg Martina z dodatkiem antybiotyków (zgodnych z PN-R-64791), drożdże agar z brzecką (BTL spółka z o. o. Zakład Enzymów i Peptonów w Łodzi).

Wyniki i omówienie

Oceniane parametry surowca przedstawiono w tab. 1 (średnie z trzech powtórzeń). Nie stwierdzono w zakiszanej zielonce występowania aflatoksyn i ochratoksyny A, metabolitów pleśni *Aspergillus* i *Penicillium*. Natomiast bada-



Ryc. 1. Kiszonka po otwarciu (obecne: *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp.)



Ryc. 2. Kiszonka po teście stabilności (dominuje: *A. fumigatus*, *P. roquefortii*, *Mucor*, *Oidium*, *Rhizoctonia*)

nia potwierdziły silne skażenie kukurydzy pleśniami, a także bardzo wysoki poziom DON (7690 ppb). Stwierdzono, że podczas fermentacji nastąpiła wyraźna redukcja DON oraz liczebności flory grzybowej. Jednak podczas ekspozycji tlenowej kiszonek nastąpił ponowny wzrost obu mikotoksyn (DON, ZON) i pleśni (szczególnie z rodzaju *Aspergillus*, *Penicillium* i *Mucor*). We wcześniejszych badaniach z dwiema odmianami kukurydzy (Barbara i Jaspe) zaobserwowano również wyraźną redukcję grzybów, drożdży i pleśni podczas procesu fermentacji. Natomiast w kiszonkach dominowały już grzyby *Penicillium* sp., chociaż *Aspergillus* sp. i *Monascus* były również obecne (5). Podobne badania przytacza Oldenburg i Höppner (12), gdzie około 90% próbek kiszonek kukurydzy zawierało DON, których maksymalne stężenie dochodziło do wartości 10 800 ppb. Autorzy wykazali, że podwyższenie z 20 do 40 cm wysokości cięcia zielonki obniża o 40% koncentrację DON. Natomiast Richter i wsp. (17) w podobnych badaniach uzyskali pięciokrotną redukcję tej mikotoksyny z 3700 ppb do 700 ppb. Według innych autorów (3, 16, 19, 20), podczas kiszenia giną przetrwalniki grzybów i występuje częściowa redukcja mikotoksyn przez florę bakteryjną i enzymy roślinne czy też łączenie się z aminokwasami, grupami SH, amoniakiem lub aminami. Jednak wskazana jest dalsza obserwacja tworzących się pochodnych, oceniając jednocześnie liczebność drożdży oraz bakterii *Clostridium* i *E. coli*. Podobne wyniki z preparatami KemiSile 2000 uzyskali Potkański i wsp. (15), którzy badali wartość pokarmową i jakość higieniczną kiszonki z kukurydzy na głębokości 60 cm, w silosie przejazdowym. Jednak po 7-dniowym okresie dostępu tlenu ponownie wyraźnie wzrosły liczne kolonie grzybów pleśniowych (szczególnie z rodzaju *Aspergillus* sp. i *Penicillium* sp.).

Przed przystąpieniem do konserwacji oznaczono liczebność wybranych drobnoustrojów epifitycznych na kukurydzy F 70. Próbkę kiszonek do analiz pobrano

po 12 tygodniach konserwacji oraz po 7 dniach ekspozycji kiszonki na działanie powietrza, określając jej stabilność tlenową (tab. 1).

Największą liczbę bakterii fermentacji mlekowej oznaczono w kombinacji z dodatkiem preparatu Lactacel L, wzrosła ona o 8,7% w porównaniu do grupy kontrolnej. Najniższą liczbę odnotowano w kombinacji z dodatkiem KemiSile 2000, która była niższa w porównaniu do grupy kontrolnej o 17,6%. Na poprawę stabilności tlenowej najsilniej wpłynął preparat Lactacel L, który obniżył liczbę bakterii fermentacji mlekowej o 15,7%, słabsze działanie wykazał preparat KemiSile 2000 – obniżył liczbę bakterii fermentacji mlekowej o 14,7%. Odnotowano także spadek liczby tych bakterii w próbce kontrolnej o 12,6%.

Bakterie z grupy *coli* najliczniej występowały w grupie kontrolnej. Preparat KemiSile 2000 obniżył liczbę tych bakterii o 29%, a Lactacel L o 11,3% w porównaniu do grupy kontrolnej. Po 7 dniach ekspozycji i dostępu powietrza liczba bakterii z grupy *-/coli* zmalała w grupie kontrolnej o 11,3%, w kombinacji z dodatkiem KemiSile 2000 o 26,1%, a w wariacie z preparatem Lactacel L o 31,5%.

Najwyższą liczbę bakterii z rodzaju *Clostridium* odnotowano w grupie kontrolnej. Stosowane dodatki spowodowały obniżenie liczby tych bakterii w porównaniu do grupy kontrolnej. Preparat KemiSile 2000 obniżył liczbę bakterii *Clostridium* o 53%, a preparat Lactacel L o 22,2%. Poprawiły one też stabilność tlenową kiszonki. W grupie kontrolnej liczba tych bakterii obniżyła się w okresie 7 dni o 40,3% w kiszonkach z preparatem KemiSile 2000 o 75%, a z dodatkiem preparatu Lactacel L o 73%.

Liczba grzybów pleśniowych po otwarciu zbiornika była najwyższa w kombinacji z preparatem Lactacel L i wzrosła o 25,9% w porównaniu do grupy kontrolnej. Preparat KemiSile 2000 obniżył liczbę komórek grzybów o 33,4% w porównaniu do grupy kontrolnej. Na poprawę stabilności kiszonek najsilniej

wpływał preparat KemiSile 2000, gdyż liczba grzybów wzrosła w tej kombinacji o 33,2% natomiast w kombinacji z preparatem Lactacel L wzrost liczby nastąpił o 42%, najmniejszą stabilność odnotowano w grupie kontrolnej, gdzie wzrost liczby nastąpił o 53,6%.

Najwyższą liczbę komórek drożdży odnotowano w grupie kontrolnej. Po zastosowaniu dodatków kiszonkarskich liczba drożdży uległa obniżeniu w próbie z KemiSile 2000 o 36,6% i o 17,6% z Lactacel L. Zastosowane dodatki kiszonkarskie miały wpływ na zawartość drożdży w kiszonkach po teście stabilności tlenowej. W grupie z KemiSile 2000 odnotowano wzrost liczby drożdży o 36,8%, w grupie kontrolnej nastąpił wzrost liczby komórek drożdży o 31,4%, a z preparatem Lactacel L liczba drożdży wzrosła o 7,7%.

Podsumowanie

Zastosowane dodatki kiszonkarskie – chemiczny KemiSile 2000 oraz mikrobiologiczny Lactacel L miały wpływ zarówno na jakość kiszzonek z kukurydzy, jak i ich stabilność. Obydwa dodatki kiszonkarskie obniżyły liczbę bakterii z grupy *-/coli* i rodzaju *Clostridium* oraz drożdży. Większą efektywnością wykazał się jednak dodatek preparatu KemiSile 2000. Liczba grzybów pleśniowych spadała tylko przy zastosowaniu dodatku preparatu chemicznego KemiSile 2000, natomiast dodatek preparatu mikrobiologicznego Lactacel L zwiększył ich liczbę.

W ocenie liczby badanych grup mikroorganizmów (grzybów, drożdży) po ekspozycji tlenowej wzrost liczby grzybów pleśniowych w największym stopniu ograniczył preparat KemiSile 2000. Dodatek preparatu Lactacel L wpłynął na ograniczenie liczby drożdży. W czasie trwania testu stabilności tlenowej liczba bakterii z grupy *-/coli* i *Clostridium* uległa obniżeniu.

Z badanych mikotoksyn we wszystkich kiszonkach stwierdzono obecność nieznacznych ilości DON, natomiast w kiszonkach z dodatkami wykryto także niewielkie ilości ZON, czego nie stwierdzono w kiszonkach grup kontrolnych. Okres ekspozycji tlenowej nie miał większego wpływu na poziom występowania DON i ZON. Stwierdzenie obecności mikotoksyn w kiszonce z kukurydzy w tym DON – toksyny wymiotnej i ZON – substancji estrogennej, wymaga jednak przeprowadzenia dalszych badań.

Piśmiennictwo

1. Bagley C. V.: Mycotoxins. Beef Cattle Handbook. University of Wisconsin 2000.
2. Chelkowski J.: Mikotoksyny i wytwarzające je grzyby. SGGW – AR, Warszawa 1985.
3. Dänicke S., Oldenburg E.: Risikofaktoren für die Fusariumtoxinebildung Futtermitteln und Vermeidungsstrategien bei der Futtermittelerzeugung und Fütterung. Landbauforschung Völkenrode (FAL) 2000, 216, s. 138.
4. Deibel R. H., Evans J. B., Niven C. F.: Microbiological assay for the thiamin using *Lactobacillus viridescens*. J. Bacteriol. 1957, 74, 818-821.
5. Grajewski J.: Aktualny problem skażenia surowców i pasz przemysłowych patogenną florą grzybową i mikotoksynami. II Konf. Nauk. Techniczna: Jakość pasz przemysłowych CLPP w Lublinie, Kazimierz Dolny 1995, s. 34-38.

6. Grajewski J., Böhm J., Luf W., Składanowska B., Szczepaniak K., Twarużek M.: The effect of harvest time on fermentation and fungal growth of two ensiled maize varieties in Austria. XIIth Internat. Silage Conference, Uppsala 5-7 July, 1999, s. 135-136.
7. Guerre P., Bailly J. D., Benard G., Burgat V.: Excretion lactee des mycotoxines: quels risques pour le consommateur? Rev. Med. Vet. 2000, 151, 7-22.
8. Keady T. W. J., O'Kiely P.: An evaluation of the rate of nitrogen fertilization of grassland on silage on silage fermentation, in silo-losses, effluent production and aerobic stability. Grass Forage Sci. 1996, 51, 350-362.
9. Kostulak-Zielińska M., Potkański A., Przybylski M., Selwet M., Perkowski J.: Wartość higieniczna kukurydzy zakiszzonej z dodatkiem konserwantu chemicznego. Medycyna Wet. 2002, 58, 792-795.
10. Lingvall P.: Influence of inoculation on preventing clostride and fungi growth in silage. 8th Inter. Symp. Forage Conservation, Brno 1997, s. 138-139.
11. Manafi M., Kneifel W.: A combined chromogenic-fluorogenic medium for simultaneous detection of total coli forms and E. coli in the water. Zntbl. Hyg. 1989, 189, 225-234.
12. Oldenburg E., Hoppner F.: Fusarium mycotoxins in forage maize-occurrence, risk assessment, minimization. Mycotoxin Res. 2003, 19, 43-46.
13. Orth D. S.: Comparison of sulfite-polymyxin-sulfadiazine medium and tryptose-sulfite-cycloserine medium without egg yolk for recovering *Clostridium perfringens*. Appl. Envir. Microbiol. 1977, 33, 986-988.
14. Potkański A., Kostulak-Zielińska M., Selwet M.: The nutritive value and aerobic stability of round baled silage from grass-alfalfa mixed crop ensiled with additives containing formic acid. XIIth Internat. Silage Conf., Uppsala 1999, s. 321-322.
15. Potkański A., Kostulak-Zielińska M., Selwet M.: The effect of additives containing formic acid on the nutritive and hygienic value of silage made from grass-legume mixtures. Internat. Conf. Animal Nutrition, Tartu 2000, s. 83-87.
16. Potkański A., Przybylski M., Goliński P., Kostulak-Zielińska M., Perkowski J., Selwet M.: Wartość pokarmowa i jakość mikrobiologiczna kiszoncek z kukurydzy zakiszzonej z dodatkiem konserwantu chemicznego. V Konf. Mikotoksyny a dioksyny a środowisko. Akademia Bydgoska, Bydgoszcz 2000, s. 185-189.
17. Richter W. I. F., Schuster M., Rattenberger E.: Einfluss der Fermentation von Silomais auf die Nachweisbarkeit von Deoxynivalenol (DON). Mycotoxin Res. 2000, 18A, 16-19.
18. Seglar B., Johnston I. A.: Mycotoxins in grain and forages: dairy health implications. Southeast Dairy Herd Management Conf., Macon 1998, s. 24-31.
19. Selwet M.: Wpływ kwasu mrówkowego na stan mikrobiologiczny kiszzonek. Medycyna. Wet. 2004, 60, 763-765.
20. Selwet M.: Wpływ konserwantów z udziałem kwasu mrówkowego na rozwój drożdży i grzybów pleśniowych w kiszonkach. Medycyna. Wet. 2005, 61, 349-352.
21. Zscheischler J., Estler M. C., Groß F., Neumann H., Geiber B.: Mais Anbau und Verwertung. DLG-Verlag, Frankfurt/Main 1979, s. 292.

Adres autora: mgr inż. Katarzyna Raczkowska-Werwinska, ul. Wołyńska 33, 60-637 Poznań