

EFEKT INOKULACJI BAKTERIAMI *LACTOBACILLUS* SPP. NA WYBRANE PARAMETRY KISZONKI Z KUKURYDZY*

Marek Selwet

Katedra Gleboznawstwa i Mikrobiologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu,
ul. Szydlowska 50, 60-656 Poznań
email: marek.selwet@gmail.com

Abstrakt

*Celem pracy było zbadanie wpływu komercyjnego inokulantu bakteryjnego CL (*Lactobacillus plantarum* K KKP/593/p, *L. plantarum* C KKP/788/p, *Lactobacillus brevis* KKP 839, *Lactobacillus buchneri* KKP 907) oraz preparatu M3 (*L. buchneri* ATCC 4005, *Lactobacillus diolivorans* LGM 19667, *Lactobacillus reuteri* ATCC 23272) na wybrane parametry kiszonki z kukurydzy. Badana kiszonka została przygotowana w minisilosach laboratoryjnych. Podstawowy skład paszy określono metodą AOAC. Stabilność tlenową mierzono jako czas potrzebny do podwyższenia temperatury kiszonki o $\geq 2^{\circ}\text{C}$ w stosunku do temperatury otoczenia. Stężenie 1-propanolu i 1,2-propanodiolu w kiszonce oznaczono z zastosowaniem chromatografii gazowej. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że w ciągu 120 dni zakiszania zastosowane preparaty istotnie ($p < 0,05$) obniżyły pH, zawartość suchej masy oraz cukrów rozpuszczalnych w wodzie w porównaniu z kiszonkami kontrolnymi. Stężenie kwasu mlekowego, octowego i propionowego w próbkach kontrolnych było istotnie niższe w porównaniu z próbkami traktowanymi inokulantem CL i M3. Dodatek CL i M3 spowodował istotny wzrost stężenia 1,2-propanodiolu i 1-propanolu w kiszonkach, obecności tych związków nie stwierdzono w kiszonkach kontrolnych. Ponadto zastosowane modyfikatory obniżyły liczebność grzybów pleśniowych i grzybów drożdżoidalnych oraz spowodowały wzrost liczebności bakterii mlekowych w kiszonkach, a także wydłużyły ich stabilność tlenową w porównaniu z kontrolą.*

Słowa kluczowe: inokulanty bakteryjne, kukurydza, kiszonka

Wstęp

Kukurydza jest jedną z powszechnie stosowanych roślin uprawianych na kiszonkę, ponieważ przy niskich kosztach pozwala uzyskać duży plon skrobi i suchej masy z hektara (Wilkinson i Rinnie, 2018). Wartość odżywcza kiszonki z kukurydzy zależy od wielu czynników, z których najważniejszym jest faza dojrzałości podczas

*Praca finansowana z działalności statutowej.

zbioru (Camarasa i in., 2021). Johnson i in. (2002) zauważyli, że dla prawidłowego przebiegu procesu zakiszania kukurydzy zawartość suchej masy powinna wynosić w granicach 35%, a głównym celem podczas produkcji kiszonki powinno być otrzymanie paszy o wysokiej jakości uzyskanej na drodze fermentacji prowadzonej przez bakterie kwasu mlekowego. Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* stanowią najliczniejszą grupę bakterii kwasu mlekowego. Mogą być szeroko stosowane jako modyfikatory mikrobiologiczne poprawiające skład chemiczny kiszonki (Selwet, 2021). Inokulacja bakteriami *Lactobacillus* spp. może wpływać na zmiany zawartości suchej masy oraz poprawiać jakość higieniczną kiszonki, za której wskaźnik uważa się liczebność bakterii, pleśni i drożdży (Dorszewski i Grabowicz, 2017). W początkowej fazie zakiszania cukry rozpuszczalne w wodzie ulegają fermentacji (głównie do kwasu mlekowego), bakterie homofermentacji mlekowej stosunkowo szybko zakwaszają środowisko, zapobiegając rozwojowi niepożądanych mikroorganizmów, głównie bakterii z rodzaju *Clostridium* spp., odpowiedzialnych za fermentację masłową. Natomiast podczas metabolizowania węglowodanów przez bakterie heterofermentacji mlekowej powstaje nie tylko kwas mlekowy, ale także krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, takie jak kwas octowy i propionowy, które hamują rozwój grzybów, mogących powodować psucie się kiszonki, zwłaszcza po otwarciu silosu (Selwet, 2021). Dlatego w celu poprawy stabilności tlenowej kiszonki opracowano inokulanty bakteryjne zawierające bakterie heterofermentacyjne, takie jak *Lactobacillus buchneri* (Nascimento Agarussi i in., 2022). Stwierdzono, że *L. buchneri* może w warunkach beztlenowych metabolizować kwas mlekowy do kwasu octowego i 1,2-propanodiolu. Wykazano także, że 1,2-propanodiol jako metabolit pośredni może ulec transformacji do 1-propanolu i kwasu propionowego przez gatunek *Lactobacillus diolivorans* (Choińska i in., 2013). Jest to bardzo ważny szlak metaboliczny, bo zarówno kwas octowy, jak i propionowy wykazują działanie przeciugrzybicze. Ponadto inny szczep bakterii *Lactobacillus reuteri* wykazuje zdolność do syntezy kobalaminy (witamina B12), będącej koenzymem dehydratazy propanodiolu, który przekształca 1,2-propanodiol do 1-propanolu i kwasu propionowego (Toraya, 2011). Zatem chcąc otrzymać kiszonki wysokiej jakości, zjawisko kofermentacji różnych substratów przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus* może indukować syntezę pożądaných metabolitów, takich jak kwas octowy, kwas propionowy i 1,2-propanodiol (Selwet, 2021). W związku z tym potrzebne są dalsze badania nad wykorzystaniem nowych mikroorganizmów w procesie zakiszania, zwłaszcza tych o działaniu przeciwdrobnoustrojowym. Mogą one mieć istotny wpływ na parametry fermentacji i wydłużenie stabilności tlenowej, a tym samym przyczynić się do poprawy jakości uzyskanej kiszonki (Nascimento Agarussi i in., 2022). Przedstawione w tej pracy wyniki są kontynuacją wcześniejszych badań prowadzonych w naszym laboratorium na dwóch odmianach kukurydzy Kresowiak (FAO 240) i San (FAO 240). Celem pracy było porównanie wpływu komercyjnego preparatu bakteryjnego (CL) zawierającego cztery szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i niekomercyjnej mieszaniny (M3) trzech szczepów *Lactobacillus* na stężenie 1,2-propanodiolu i 1-propanolu, skład chemiczny oraz liczebność populacji bakterii kwasu mlekowego, grzybów drożdżoidalnych i pleśni w kiszonkach z kukurydzy. Badania koncentrowały się także na określeniu synergistycznej skuteczności mieszanek bakterii z rodzaju *Lactobacillus* na wydłużenie czasu stabilności tlenowej kiszonki.

Material i metody

Material roślinny

Kukurydza (*Zea mays* L.) odmiany Fortop (FAO 230) pochodziła z Hodowli Roślin Smolice Sp. z o. o. Grupa IHAR. Kukurydza trójliniowa (TC), o typie ziarna semi flint. Obsada roślin wynosiła 95 000 ha⁻¹. Zbioru dokonano w fazie BBCH 75 (pełnia dojrzałości mlecznej). Zawartość suchej masy wynosiła 38%. Kukurydzę ścięto na wysokości 30 cm, a przed zakiszeniem rozdrobniono na sieczkę o długości 6 mm. Uprawę kukurydzy prowadzono w monokulturze.

Inokulanty bakteryjne

CL – (preparat komercyjny) zawierał kultury *L. plantarum* K KKP/593/p, *L. plantarum* C KKP/788/p, *L. brevis* KKP 839 i *L. buchneri* KKP 907. Dawka zalecana przez producenta wynosiła 5 g t⁻¹ zakiszanego materiału. Koncentracja bakterii w 1 g preparatu wynosiła 10⁹ jtk g⁻¹ (Lactosil, Polsil).

M3 – (mieszanka 3 kultur) *L. buchneri* ATCC 4005, *L. diolivorans* LGM 19667, *L. reuteri* ATCC 23272 (DSMZ). Zastosowano dawkę 5 ml t⁻¹ zakiszanego materiału. Koncentracja bakterii w 1 ml mieszaniny wynosiła 10⁹ jtk g⁻¹.

Sposób zakiszania

Kiszonki sporządzono w minisilosach laboratoryjnych o pojemności 5 dm³, wykonanych z PCV, z zamknięciem umożliwiającym odprowadzenie produktów gazowych (ilość powtórzeń dla poszczególnych kombinacji wynosiła 10). Temperatura pomieszczenia podczas zakiszania wynosiła średnio 20°C ± 2°C. Czas zakiszania wynosił 120 dni.

Analizy mikrobiologiczne

Liczebność bakterii mlekowych oznaczano na MRS Agar (Oxoid) zgodnie z normą PN-EN 15787:2022-04. Czas inkubacji 72 h w temperaturze 37°C w warunkach o obniżonej zawartości tlenu. Grzyby drożdżoidalne hodowano na podłożu agarowym YPD (Sigma), (YPD, 2006), a grzyby pleśniowe oznaczano na OGYE Agar (Oxoid) (Mossel i in., 1970) z dodatkiem oksytetracykliny (oxytetracycline-glucose-yeast-extract agar). Czas inkubacji wynosił 5–7 dni w temperaturze 24°C.

Analizy chemiczne

Stężenie kwasu mlekowego, octowego, propionowego, etanolu oraz 1-propanolu i 1,2-propanediolu określano z zastosowaniem chromatografu gazowego wyposażonego w detektor FID, szklaną kolumnę 80/100 Chromosorb WAW (SUPELCO) o długości 2 m, I.D. 2 mm z wypełnieniem GP 10% SP – 1200/1% H₃PO₄ oraz autosamplerem Varian 8200 CX. Gazem nośnym był wodór (przepływ 30 cm³ min⁻¹), temperatura pieca 120°C, temperatura nastrzyku 250°C, temperatura detektora 300°C.

Standard stanowiły wzorce kwasów firmy Fluka. Skład podstawowy pasz oznaczono zgodnie z AOAC (2019). Wartości pH oznaczono, stosując pH Meter Hann Instruments w zawieszynie przygotowanej z 10 g kiszonki i 190 cm³ destylowanej wody, homogenizowano przez 20 minut. W celu określenia zawartości suchej masy próbki kiszonek suszono w temperaturze 65°C przez okres 48h (GZX-9140MBE, Shanghai Boxun Co., Ltd., Shanghai). Białko surowe oznaczano metodą Kjeldahla (Kjeltec 2300 AutoAnalyzer, FOSS Analytical AB, Hoganas, Sweden). Koncentrację cukrów rozpuszczalnych w wodzie oznaczono zgodnie z metodyką podana przez Murphy (2010).

Test stabilności tlenowej

Podczas przeprowadzenia testu stabilności tlenowej badane próbki poddano napowietrzaniu przez okres 180 h w temperaturze 20°C ± 2°C. Po tym okresie badano zmiany liczebności drobnoustrojów i wybranych parametrów chemicznych kiszonki. Wilgotne próbki o masie 100 g pobrano po 120 dniach zakiszania z minisilosów i umieszczono w plastikowych pojemnikach o objętości 500 cm³ z otworami o średnicy 10 mm umożliwiającymi cyrkulację powietrza. Zmiany temperatury mierzono co 5 minut w odstępach dwugodzinnych z wykorzystaniem czytnika temperatury (Hotmux DDC Corporation, Pennsauken, NJ, USA). Stabilność definiowano jako czas potrzebny do podniesienia temperatury kiszonki o $\geq 2^\circ\text{C}$ w stosunku do temperatury otoczenia. Każdą kombinację wykonano w 5 powtórzeniach, łącznie wykonano 15 pomiarów.

Analiza statystyczna

Obliczenia statystyczne wykonano przy zastosowaniu pakietu procedur GLM SAS (2002). Normalność rozkładu sprawdzano testem Shapiro-Wilka. Różnice między średnimi testowano stosując test Tukeya na poziomie istotności $\alpha=0,05$.

Wyniki

W tabeli 1 przedstawiono skład chemiczny oraz liczebność bakterii kwasu mlekowego, grzybów drożdżoidalnych i pleśniowych w zielonej masie kukurydzy przeznaczanej do zakiszania. Zawartość cukrów rozpuszczalnych w wodzie na poziomie 90,2 g kg⁻¹ suchej masy pozwoliła uznać materiał roślinny za dobry do zakiszania.

Tabela 2 przedstawia skład chemiczny i liczebność drobnoustrojów po 120 dniach zakiszania. W kiszonkach traktowanych inokulantami bakteryjnymi CL i M3 stwierdzono istotnie niższe stężenie suchej masy i węglowodanów rozpuszczalnych w wodzie ($p<0,05$) w porównaniu z próbkami kontrolnymi. Kiszonki traktowane modyfikatorami zawierającymi bakterie *Lactobacillus* (CL, M3) cechowały się również niższym pH. Nie wykazano istotnego wpływu inokulantów M3 i CL na zmiany zawartości białka surowego w badanych kiszonkach. Koncentracja kwasu mlekowego, octowego i propionowego była znacznie wyższa w próbkach traktowanych inokulantami mikrobiologicznymi (CL, M3). Jednak zawartość kwasu propionowego była istotnie wyższa w próbkach potraktowanych preparatem M3. W kiszonkach kontro-

lnych nie stwierdzono obecności 1,2-propanodiolu i 1-propanolu. Dodatki CL i M3 spowodowały znaczny wzrost stężeń tych substancji w kiszonkach doświadczalnych. Próbkki kiszonek traktowane inokulantem M3 cechowały się wyraźnym wzrostem stężenia 1,2-propanodiolu i 1-propanolu. Próbkki z dodatkiem M3 zawierały o 202% wyższe stężenie 1,2-propanodiolu i o 143% 1-propanolu. Zastosowane w badaniach mieszaniny szczepów *Lactobacillus* (CL, M3) spowodowały istotny wzrost liczebności bakterii kwasu mlekowego o 27,2% i 28,7% w porównaniu do kontroli oraz obniżenie liczebności populacji grzybów drożdżoidalnych relatywnie o 27,9% i 28,5%. Nie zaobserwowano istotnego wpływu inokulacji preparatem CL na ogólną liczebność grzybów pleśniowych w porównaniu z kontrolą, natomiast zastosowanie preparatu M3 wpłynęło na obniżenie liczebności grzybów pleśniowych o 23,6%. W tabeli 3 przedstawiono zmiany składu chemicznego kiszonki, liczebności drobnoustrojów oraz wyniki testu stabilności tlenowej. Wykazano istotny wpływ zastosowanych preparatów CL i M3 na obniżenie wartości pH kiszonek w porównaniu do kontroli. Stężenie kwasu mlekowego, octowego i propionowego w próbkach zawierających szczepy *Lactobacillus* było istotnie wyższe niż w próbce kontrolnej. Kiszonki z dodatkiem preparatu M3 charakteryzowały się istotnie wyższym stężeniem tych kwasów w porównaniu z próbkami z inokulowanymi preparatem CL. W próbkach kontrolnych nie stwierdzono obecności 1,2-propanodiolu i 1-propanolu. W kombinacjach CL i M3 stężenie tych substancji było niższe niż przed testem stabilności tlenowej. W próbkach zawierających CL stwierdzono obniżenie stężenia tych substancji odpowiednio o 40,3% i 59,5%, a w próbkach z M3 o 6,4% i 8,9%. Liczebność bakterii kwasu mlekowego w kiszonce zawierającej dodatki CL i M3 była wyższa odpowiednio o 45,7% i 47,3% w porównaniu z próbką kontrolną. Z drugiej strony liczba grzybów drożdżoidalnych uległa znacznemu obniżeniu odpowiednio o 18,3% i 31,5%. Preparat M3 istotnie wpływał na obniżenie liczebności grzybów pleśniowych (28,3%). Preparaty CL i M3 spowodowały wydłużenie stabilności tlenowej kiszonki odpowiednio o 122 i 179 h w porównaniu z kontrolą.

Tabela 1. Zawartość suchej masy, skład chemiczny, pH oraz liczebność bakterii kwasu mlekowego, grzybów drożdżoidalnych i pleśniowych w kukurydzy przed zakiszeniem

Table 1. Dry matter content, chemical composition, pH, and the number of lactic acid bacteria, yeast-like fungi and mold fungi in maize before ensiling

Sucha masa (g kg ⁻¹)	392
Dry matter (g kg ⁻¹)	
pH	5,45
Białko surowe (g kg ⁻¹ s.m.)	80,12
Crude protein (g kg ⁻¹ DM)	
Cukry rozpuszczalne w wodzie (g kg ⁻¹ s.m.)	90,2
Water-soluble carbohydrates (g kg ⁻¹ DM)	
Bakterie kwasu mlekowego (log jtk g ⁻¹)	6,27
Lactic acid bacteria (log CFU g ⁻¹)	
Grzyby drożdżoidalne (log jtk g ⁻¹)	7,28
Yeast-like fungi (log CFU g ⁻¹)	
Grzyby pleśniowe (log jtk g ⁻¹)	5,89
Mold fungi (log CFU g ⁻¹)	

Tabela 2. Charakterystyka kiszonki z kukurydzy po 120 dniach fermentacji
Table 2. Characteristics of maize silage at 120 days of fermentation

Parametry Parameters	Kombinacje Treatments					
	Kontrola Control	SEM	CL	SEM	M3	SEM
Sucha masa(g kg ⁻¹)	387.00 a	1.43	354.00 b	1.29	362.00 b	1.20
Dry matter (g kg ⁻¹)						
pH	4.87 a	0.04	4.04 b	0.09	4.00 b	0.09
Białko surowe (g kg ⁻¹ s.m.)	77.80 a	0.71	78.01 a	0.53	78.04 a	0.53
Crude protein (g kg ⁻¹ DM)						
Cukry rozpuszczalne w wodzie (g kg ⁻¹ s.m.)	53.90 a	3.88	48.20 b	3.12	47.80 b	2.41
Water-soluble carbohydrates (g kg ⁻¹ DM)						
Kwas mlekowy (% s.m.)	5.21 a	0.49	6.71 b	0.45	7.12 c	0.36
Lactic acid (% DM)						
Kwas octowy (% s.m.)	1.15 a	0.04	2.81 b	0.04	3.21 c	0.04
Acetic acid (% DM)						
Kwas propionowy (% s.m.)	0.00 c	...	1.12 b	0.04	1.73 a	0.04
Propionic acid (% DM)						
1,2-Propanediol (% s.m.)	0.00 c	...	0.57 b	0.09	1.72 a	0.04
1,2-Propanediol (% DM)						
1-Propanol (% s.m.)	0.00 c	...	0.37 b	0.01	0.90 a	0.01
1-Propanol (% DM)						
Etanol (% s.m.)	0.79 a	0.04	0.81 a	0.004	0.80 a	0.004
Ethanol (% DM)						
Bakterie kwasu mlekowego (log jtk g ⁻¹)						
Lactic acid bacteria (log CFU g ⁻¹)	7.01 a	0.62	8.92 b	0.18	9.02 b	0.18
Grzyby drożdżoidalne (log jtk g ⁻¹)						
Yeast-like fungi (log CFU g ⁻¹)	5.73 a	0.58	4.13 b	0.31	4.10 b	0.22
Grzyby pleśniowe (log jtk g ⁻¹)						
Mold fungi (log CFU g ⁻¹)	5.33 a	0.36	5.42 a	0.18	4.07 b	0.13

*Średnie oznaczone różnymi literami w rzędzie różnią się istotnie statystycznie (p<0.05). SEM – błąd standardowy średniej. CL – *L. plantarum* K KKP/593/p. *L. plantarum* C KKP/788/p. *L. brevis* KKP 839. *L. buchneri* KKP 907; M3 – *L. buchneri* ATCC 4005. *L. diolivorans* LGM 19667, *L. reuteri* ATCC 23272.

*Means with different letters in a row differ significantly (p<0.05). SEM – standard error of the mean. CL – *L. plantarum* K KKP/593/p. *L. plantarum* C KKP/788/p. *L. brevis* KKP 839. *L. buchneri* KKP 907; M3 – *L. buchneri* ATCC 4005. *L. diolivorans* LGM 19667, *L. reuteri* ATCC 23272.

Tabela 3. Charakterystyka kiszonki z kukurydzy po teście stabilności tlenowej
Table 3. Characteristics of maize silage after the aerobic stability test

Parameters	Kombinacje Treatments					
	Kontrola Control	SEM	CL	SEM	M3	SEM
pH	6.15 a	0.13	4.78 b	0.04	4.51 b	0.04
Kwas mlekowy (% s.m.) Lactic acid (% DM)	4.71 a	0.18	5.70 b	0.27	6.41 c	0.22
Kwas octowy (% s.m.) Acetic acid (% DM)	1.29 a	0.09	3.31 b	0.13	4.12 c	0.31
Kwas propionowy (% s.m.) Propionic acid (% DM)	0.00 c	...	0.91 b	0.31	1.31 a	0.27
1,2-Propanediol (% s.m.) 1,2-Propanediol (% DM)	0.00 c	...	0.34 b	0.04	1.61 a	0.13
1-Propanol (%s.m.) 1-Propanol (% DM)	0.00 c	...	0.15 b	0.04	0.82 a	0.04
Bakterie kwasu mlekowego (log jtk g ⁻¹) Lactic acid bacteria (log CFU g ⁻¹)	5.71 a	0.03	8.32 b	0.04	8.41 b	0.05
Grzyby drożdżoidalne (log jtk g ⁻¹) Yeast-like fungi (log CFU g ⁻¹)	7.47 a	0.04	6.10 b	0.05	5.12 c	0.05
Grzyby pleśniowe (log jtk g ⁻¹) Mold fungi (log CFU g ⁻¹)	6.99 a	0.09	6.43 a	0.08	5.01 c	0.40
Stabilność tlenowa (h) Aerobic stability (h)	48 a	0.04	170 b	0.01	227 c	0.09

*Średnie oznaczone różnymi literami w rzędzie różnią się istotnie statystycznie ($p < 0.05$). SEM – błąd standardowy średniej. CL – *L. plantarum* K KKP/593/p, *L. plantarum* C KKP/788/p, *L. brevis* KKP 839, *L. buchneri* KKP 907; M3 – *L. buchneri* ATCC 4005, *L. diolivorans* LGM 19667, *L. reuteri* ATCC 23272.

*Means with different letters in a row differ significantly ($p < 0.05$). SEM – standard error of the mean. CL – *L. plantarum* K KKP/593/p, *L. plantarum* C KKP/788/p, *L. brevis* KKP 839, *L. buchneri* KKP 907; M3 – *L. buchneri* ATCC 4005, *L. diolivorans* LGM 19667, *L. reuteri* ATCC 23272.

Omówienie wyników

Stabilność tlenową kiszonki z kukurydzy można poprawić, stosując różne szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. W przedstawionych wynikach badań porównano działanie dostępnego w handlu preparatu CL z działaniem preparatu (M3) zawierającego szczepy bakterii heterofermentacji mlekowej *L. diolivorans*, *L. buchneri* i *L. reuteri*. Rezende i in. (2011) zaobserwowali, że kiszonka wystawiona na działanie tlenu ulegała istotnym zmianom, które dotyczyły składu chemicznego i wykazywała skłonność do szybszego zagrzewania się. O synergistycznym wpływie kombinacji różnych szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* na poprawę stabilności kiszonki czytamy w pracach wielu autorów (Zielińska i in., 2015; Muck i in., 2017; Selwet, 2021). Za bardzo ważną cechę uważa się zdolność tych bakterii do syntezy 1,2-propanodiolu, którą cechuje się nowy szczep *L. buchneri* KPP 907 p (Zielińska i in., 2014; Zielińska i in., 2017). Z kiszonek z kukurydzy można także wyizolować szczepy *L. diolivorans* sp. nov. zdolne do metabolizowania 1,2-propanodiolu (Charley i Kung Jr, 2005), a także szczepy prowadzące syntezę kobalaminy, takie jak *L. reuteri* (Hammes i Hertel, 2009; Toraya, 2011; Sun i in., 2014). W badaniach składu chemicznego próbek kiszonki z kukurydzy po zaszczepieniu jej szczepami *L. buchneri*, *L. plantarum* i *Lactobacillus rhamnosus* Driehuis i in. (2001), Jungbluth i in. (2017) oraz Selwet (2021) odnotowali wzrost stężenia kwasu octowego i 1,2-propanodiolu. Fakt ten potwierdzają wyniki prezentowane w niniejszej pracy. Należy jednak pamiętać, że nadmierne stężenie kwasu octowego może negatywnie wpływać na smakowość kiszonek i zmniejszać pobieranie tej paszy przez zwierzęta. Oliveira i in. (2017) odnotowali odmienne wyniki i stwierdzili obniżenie ($p < 0,01$) zawartości kwasu octowego i wzrost koncentracji kwasu mlekowego w próbkach kiszonek z kukurydzy z dodatkiem szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. Oliveira i in. (2017) oraz Selwet (2021) zauważyli, że traktowanie kiszonki z kukurydzy pojedynczym szczepem lub mieszaniną *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *Pediococcus pentosaceus*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. diolivorans*, *L. reuteri* znacząco wpływało na obniżenie pH i stężenia cukrów rozpuszczalnych w wodzie. Ten fakt potwierdzają wyniki obecnych badań własnych. Oliveira i in. (2017) i Selwet (2021) zaznaczyli również, że efekt inokulacji w dużej mierze może zależeć od typu i stadium rozwoju (BBCH) zakiszanej rośliny. Inokulanty bakteryjne użyte w badaniu własnym nie wpłynęły na zmiany stężenia białka surowego w kiszonkach. Odmienne wyniki uzyskali Silva i in. (2014), którzy po zastosowaniu dwóch szczepów *L. buchneri* w kiszonce z kukurydzy odnotowali wzrost stężenia białka surowego w porównaniu do próbki kontrolnej. Bumbieris i in. (2017) stosując szczep *L. buchneri* CCT 3746 oznaczyli w kiszonce z kukurydzy stężenie białka surowego na poziomie 7,47% w próbkach inokulowanych, a 6,87% w kontroli. Wyniki badań własnych dotyczące testu stabilności tlenowej wykazały wzrost stężenia kwasu octowego w próbkach z dodatkami mikrobiologicznymi (liczba bakterii w 1 g preparatu wynosiła 10^9 jtk g^{-1}). Zbieżne wyniki uzyskali Basso i in. (2012) po inokulacji kiszonki z kukurydzy szczepem *L. buchneri* 40788 9 (koncentracja bakterii w 1 g preparatu wynosiła 10^5 jtk g^{-1}). Ranjit i Kung Jr (2000) zauważyli, że podczas ekspozycji tlenowej kiszonek z kukurydzy produkcja kwasu octowego przez bakterie z rodzaju *Lactococcus* jest stale kontynuowana, a obniżeniu ulega koncentracja kwa-

su mlekowego. W takich kiszonkach odnotowuje się stałe obniżanie pH, ponieważ kwas octowy wykazuje wyższe wartości pKa niż kwas mlekowy (Choińska i in., 2013). Wyniki badań własnych wykazują wyraźny wpływ zastosowanych preparatów CL i M3 na obniżenie liczebności populacji grzybów drożdżoidalnych i grzybów pleśniowych zarówno w świeżych kiszonkach, jak i tych poddanych ekspozycji tlenowej. Modyfikator M3 wykazywał silniejsze działanie fungistatyczne. Fabiszewska i in. (2019) zauważyli, że produkcja substancji fungistatycznych, w tym kwasu octowego i propionowego, może w dużej mierze zależeć od fazy wzrostu bakterii, temperatury podłoża, składu chemicznego i pH środowiska.

Wnioski

Na podstawie uzyskanych wyników badań można stwierdzić, że kiszonki inokulowane szczepami bakterii z rodzaju *Lactobacillus* charakteryzowały się wydłużoną stabilnością tlenową w porównaniu z kiszonkami kontrolnymi. Szczepy M3 (*L. buchneri* ATCC 4005, *L. diolivorans* LGM 19667, *L. reuteri* ATCC 23272) wykazywały silniejsze działanie stabilizujące niż komercyjny preparat CL (*L. plantarum* K KKP/593/p, *L. plantarum* C KKP/788 /p, *L. brevis* KKP 839, *L. buchneri* KKP 907). Próbkki kiszonek z dodatkiem preparatu M3 zawierały wyższe stężenie kwasu octowego i propionowego oraz niższe pH niż próbki kontrolne, a także mniejszą liczebność grzybów drożdżoidalnych i grzybów pleśniowych. Kiszonki zaszczerpione heterofermentacyjnymi szczepami *Lactobacillus* (M3) zawierały wyższe stężenia 1,2-propanodiolu i 1-propanolu w porównaniu z kontrolą. Mieszanka szczepów M3 w porównaniu z preparatem CL wydaje się skuteczniejszym inokulantem bakteryjnym, mogącym efektywniej poprawić stabilność tlenową kiszonki.

Piśmiennictwo

- AOAC (2019). Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of AOAC International. 21st edition. Arlington, VA, USA.
- Basso F.C., Bernardes T.F., Toledo A.P., Roth P., Lodo B.N., Berchielli T.T., Reis A. (2012). Fermentation and aerobic stability of corn silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*. Rev. Bras. Zootec., 41: 1789–1794; doi: 10.1590/S1516-35982012000700032.
- Bumbieris Jr V.H., Guimarães V.A.P., Fortaleza A.P.S., Massaro Jr F.L., Moraes G.J., Meza D.A.R. (2017). Aerobic stability in corn silage (*Zea mays* L.) ensiled with different microbial additives. Acta Sci. Anim. Sci., 39: 357–362; doi: 10.4025/actascianimsci.v39i4.34426.
- Camarasa J.N., Auil M., Barletta P., Bereterbide L. (2021). Aerobic stability of whole plant corn silage inoculated with a bacterial inoculant in three maturity stages. Revista RIA-INTA, 47: 82–87.
- Charley R., Kung Jr L. (2005). Treatment of silage with *Lactobacillus diolivorans*. Patent No US 2005/0281917 A1.
- Choińska R., Giryń H., Bartosiak E., Kotyrba D. (2013). Effect of dry mass and bacterial silage inoculant on the content of organic acids in silages. Postępy Nauki Technol. Prz. Rol.-Spoż., 68: 15–14.
- Dorszewski P., Grabowicz M. (2017). The mycological status of green forages and silages from a mixture of legumes with grasses and whole crop maize. Folia Pomer. Univ. Technol. Stetin., Agric., Aliment., Pisc., Zootech., 33: 33–40.

- Driehuis F., Oude Elferink S.J., Van Wikselaar P.G. (2001). Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria. *Grass Forage Sci.*, 56: 330–343; doi: 10.1046/j.1365-2494.2001.00282.x.
- Fabiszewska A.U., Zielińska K.J., Wróbel B. (2019). Trends in designing microbial silage quality by biotechnological methods using lactic acid bacteria inoculants: a minireview. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 35: 76; doi: 10.1007/s11274-019-2649-2.
- Hammes W.P., Hertel C. (2009). Genus *Lactobacillus beijerinck* 1901, 212AL. The Firmicutes. W: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, De Vos P., Garrity G.M., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K., Whitman W.B. (red.). 2nd Ed. Springer, New York, Vol. 3, ss. 465–490.
- Johnson L.M., Harrison J.H., Davidson D., Mahanna W.C., Shinnors K., Linder D. (2002). Corn silage management: Effects of maturity, inoculation, and mechanical processing on pack density and aerobic stability. *J. Dairy Sci.*, 85: 434–444.
- Jungbluth K.H., Trimborn M., Maack G.K., Büscher W., Li M., Cheng H., Cheng Q., Sun Y. (2017). Effects of three different additives and two different bulk densities on maize silage characteristics, temperature profiles, CO₂ and O₂ dynamics in small scale silos during aerobic exposure. *Appl. Sci.*, 7: 545; doi: 10.3390/app7060545.
- Mossel D.A.A., Kleynen-Semmeling A.M.C., Vincentie H.M., Beerens H., Catsaras M. (1970). Oxytetracycline-Glucose-Yeast Extract Agar for selective enumeration of moulds and yeasts in foods and clinical material. *J. Appl. Bact.*, 33: 454–457.
- Muck R.E., Nadeau E.M.G., McAllister T.A., Contreras-Govea F.E., Santos M.C., Kung Jr L. (2017). Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. *J. Dairy Sci.*, 101: 3980–4000; doi: 10.3168/jds.2017-13839.
- Murphy R.P. (2010). A method for the extraction of plant samples and the determination of total soluble carbohydrates. *J. Sci. Food Agric.*, 9; doi.org/10.1002/jsfa.2740091104.
- Nascimento Agarussi M.C., Pereira O.G., da Silva L.D., da Silva V.P., de Paula R.A., Fonseca e Silva F., Guimarães Ribeiro K. (2022). Effect of various strains of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation quality and aerobic stability of corn silage. *Agriculture*, 12, 95; doi: 10.3390/agriculture 12010095.
- Oliveira A.S., Weinberg Z.G., Ogunade I.M., Cervantes A.A.P., Arriola K.G., Jiang Y., Kim D., Li X., Goncalves M.C.M., Vyas D., Adesogan A.T. (2017). Meta-analysis of effects of inoculation with homofermentative and facultative heterofermentative lactic acid bacteria on silage fermentation, aerobic stability, and the performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 100: 4587–4603; doi: 10.3168/jds.2016-11815.
- Ranjit N.K., Kung Jr L. (2000). The effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, or a chemical preservative on the fermentation and stability of corn silage. *J. Dairy Sci.*, 83: 526–535.
- Rezende A.V., Rabelo C.H.S., Rabelo F.H.S., Nogueira D.A., Faria Jr D.C.N.A., Barbosa L.A. (2011). Perdas fermentativas e estabilidade aeróbia de silagens de cana-de-açúcar tratadas com cal virgem e cloreto de sódio. *Rev. Bras. Zootec.*, 40: 739–746.
- SAS (2002). *User's Guide: Statistics*, Version 9.1 ed. SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA.
- Selwet M. (2021). The effect of inoculation with *Lactobacillus* spp. on the production of 1,2-propanediol and 1-propanol, hygienic quality and aerobic stability of maize silage. *Pol. J. Agron.*, 45: 21–27; doi: 10.26114/pja.iung.459.2021.45.03.
- Silva N.C., Santos J.P., Ávila C.L.S., Evangelista A.R., Casagrande D.R., Bernardes T.F. (2014). Evaluation of the effects of two *Lactobacillus buchneri* strains and sodium benzoate on the characteristics of corn silage in a hot-climate environment. *Grassl. Sci.*, 60: 169–177; doi: 10.1111/grs.12053.
- Sun Z., Yu J., Dan T., Zhang W., Zhang H. (2014). Phylogenesis and evolution of lactic acid bacteria. In: *Lactic acid bacteria, fundamentals and practice*. H. Zhang and Y. Cai, ed. Springer Science Business Media, New York, NY, USA, 101 ss.
- Toraya T. (2011). The structure and the mechanism of action of coenzyme B12-dependent diol dehydratases. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 10: 87–106; doi: 10.1016/S1381-1177(00)00117-X.
- Wilkinson J.M., Rinnie M. (2018). Highlights of progress in silage conservation and future perspectives. *Grass and Forage Sci.*, 73: 40–52.

- YPD (2006). "Cold Spring Harbor Protocols", Cold Spring Harbor Laboratory Press, doi:10.1101/pdb.rec8194.
- Zielińska K., Fabiszewska A., Stecka K., Świątek M. (2014). A new strain of *Lactobacillus buchneri* A, composition, a multi-component preparation for starch-rich plant preservation, their use and a method for plant preservation. Patent No. EP 2 785826.
- Zielińska K., Miecznikowski A., Stecka K., Stefańska I., Fabiszewska A., Kupryś-Caruk M., Bartosiak E. (2015). Badania nad poprawą aktywności biologicznej preparatów bakteryjnych do kiszenia roślin wysokoskrobiowych. Sprawozdanie z realizacji tematu BST o symbolu: 500-01- ZF-05, IBPRS w Warszawie.
- Zielińska K.J., Fabiszewska A.U., Wróbel B. (2017). Impact of bacterial preparation on the improvement of aerobic stability and biogas yield from meadow sward silage. *J. Agric. Eng. Res.*, 62: 219–222.

Zatwierdzono do druku: 12 VII 2022

Marek Selwet

THE EFFECT OF INOCULATION WITH *LACTOBACILLUS* SPP. ON SELECTED PARAMETERS OF MAIZE SILAGE

SUMMARY

The study aimed to investigate the effect of a commercial bacterial inoculant CL (*Lactobacillus plantarum* K KKP/593/p, *L. plantarum* C KKP/788/p, *Lactobacillus brevis* KKP 839, *Lactobacillus buchneri* KKP 907) and an M3 preparation (*L. buchneri* ATCC 4005, *Lactobacillus diolivorans* LGM 19667, *Lactobacillus reuteri* ATCC 23272) on selected parameters of maize silage. The silage tested in the study was prepared in laboratory mini-silos. The basic composition of the feed was determined using the AOAC method. Oxygen stability was measured as the time needed to increase the silage temperature by $\geq 2^{\circ}\text{C}$ of the ambient temperature. The concentration of 1-propanol and 1,2-propanediol in silage was estimated using a gas chromatograph. The results indicated that during 120 days of ensilage, the applied preparations significantly ($p < 0.05$) reduced the pH and the content of dry matter, and water-soluble sugars in silages compared to the control silage. The concentration of lactic, acetic, and propionic acids in the control samples was significantly lower compared to the samples containing CL and M3. The addition of CL and M3 caused a significant increase in the concentration of 1,2-propanediol and 1-propanol in the silages, whereas these compounds were not found in the control silage. Furthermore, the applied inoculants reduced the number of mold fungi and yeast-like fungi and increased the number of lactic bacteria in the silages and also extended their aerobic stability compared to the control.

Key words: bacterial inoculant, maize silage