

MARIOLA GALBAS¹, MAREK SELWET², PIOTR DULLIN¹, FILIP PORZUCEK³,
WITOLD SKRZYPCZAK⁴

¹Katedra Biochemii i Biotechnologii
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

²Katedra Mikrobiologii Ogólnej i Środowiskowej
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

³Koło Naukowe „Operon”
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

⁴Katedra Agronomii
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

INTERAKCJE WYSTĘPUJĄCE POMIĘDZY MIKROORGANIZMAMI W KISZONKACH Z SORGO A BAKTERIAMI WYZOŁOWANYMI Z PYSKÓW I ODBYTÓW KRÓW

Streszczenie. Sorgo, będąc rośliną dnia krótkiego, nie tworzy w warunkach Polski dojrzałych nasion, wytwarza jednak obfity plon zielonej masy. Z tego względu wykorzystuje się tę roślinę na kiszonkę uzupełniającą obok kisonki z kukurydzy. Cel pracy dotyczył analizy składu chemicznego kisonki z kukurydzy i właściwości antagonistycznych mikroorganizmów obecnych w kisonce z ‘Sucrosorgo 506’ wobec bakterii potencjalnie zakaźnych występujących w pyskach i odbytach krów. Skład chemiczny kisonki z ‘Sucrosorgo 506’ oznaczono zgodnie z AOAC. Zbadano występowanie grzybów pleśniowych, drożdży, bakterii fermentacji mlekowej i *Enterobacteriaceae*. Analiza właściwości antagonistycznych wykazała obecność stref zahamowania wzrostu w przypadku murawek z bakterii: *Shigella* spp. i *Salmonella* spp. Wobec *Escherichia coli* nie zaobserwowano stref zahamowania wzrostu. Głównymi mikroorganizmami wykazującymi te właściwości okazały się bakterie mlekowe *Lactobacillus brevis*.

Słowa kluczowe: antagonizm, bakterie patogenne, bakterie mlekowe, PCR, strefy zahamowania wzrostu

Wstęp

Najważniejszą paszą objętościową stosowaną w żywieniu bydła jest kukurydza. Jednak przy zmiennych warunkach pogodowych i związanych z tym niedoborach wody

rośliną alternatywną stało się w ostatnich latach sorgo. Jest to roślina uprawiana w rejonach suchych lub zbyt gorących dla innych roślin. Sorgo, podobnie jak kukurydza, jest rośliną o typie fotosyntezy C-4, lecz bardziej efektywnie niż kukurydza gospodaruje wodą. Jak podaje ROLNICZY MAGAZYN ELEKTRONICZNY (2008), w warunkach głębszej suszy rośliny wstrzymują vegetację, by ponownie kontynuować wzrost, gdy zaistnieją sprzyjające warunki wilgotnościowe. Jednak w naszym klimacie sorgo nie wytwarza dojrzałych nasion, za to daje obfite plony zielonej masy. W związku z dużym potencjałem plonowania, dużą zawartością cukru oraz innymi korzystnymi cechami sorgo coraz częściej wykorzystuje się na kiszonkę uzupełniającą wobec kukurydzy (KOZŁOWSKI i IN. 2009). Jedną z odmian dostępnych w Polsce jest 'Sucrosorgo 506' – jest to odmiana sorgo cukrowego. Istnieją obawy dotyczące stosowania sorgo jako rośliny paszowej ze względu na obecność w nim substancji antyżywnościowych, takich jak tanniny – pogarszające smakowość oraz duriny, z których po rozłożeniu powstaje kwas pruski. Jednak doświadczenia BOLSENA i IN. (2003) dowiodły, że w prawidłowo wykonanej kiszonce kwas pruski rozkłada się mniej więcej po trzech tygodniach. W porównaniu z kukurydzą produkcja kiszonek z 'Sucrosorgo 506' nie napotyka dużych trudności, ponieważ zawiera większe stężenie cukrów prostych. MICHALSKI (2009) uważa, że kiszonki uzyskane z sorgo cechuje mniejsza koncentracja energii ze względu na brak kolb, dlatego wykorzystuje się je w żywieniu krów mlecznych o mniejszej wydajności.

Dobrze przygotowana kiszonka zawiera przede wszystkim bakterie mlekowe, mające właściwości prozdrowotne oraz ułatwiające zakiszanie. Bakterie te w procesie fermentacji wytwarzają kwas mlekowy, dużą ilość kwasu octowego oraz 1,2-propanediol, propanol i kwas propionowy. Duża ilość kwasu octowego i obecność propionowego w kiszonce przyczynia się do znacznego ograniczenia rozwoju drożdży i grzybów pleśniowych, zwiększając okres stabilności tlenowej kiszonki. Bakterie mlekowe dzięki produkcji bakteriocyn wykazują antagonizm w stosunku do bakterii patogennych bytujących w przewodzie pokarmowym, poprawiając tym samym właściwości sanitarno-epidemiologiczne paszy.

Celem pracy była analiza składu chemicznego kiszonki z 'Sucrosorgo 506' zakiszanej bez dodatków oraz obecności w niej mikroorganizmów o właściwościach antagonicznych w stosunku do bakterii *E. coli*, *Shigella* spp. oraz *Salmonella* spp. występujących w pyskach i odbytach krów.

Materialy i metody

Rośliną poddaną kiszeniu i dalszym analizom było sorgo cukrowe odmiany 'Sucrosorgo 506'.

Analiza składu chemicznego kiszonki z 'Sucrosorgo 506' dotyczyła oznaczenia zawartości suchej masy, białka ogólnego, cukrów redukujących, kwasu mlekowego, octowego i mrówkowego, etanolu oraz pomiaru pH kiszonki. Skład chemiczny oznaczono zgodnie z metodami AOAC (OFFICIAL METHODS... 2001).

Z silosów z kiszoną pobierano próbkę o masie 1 kg. Roztwór do analiz przygotowano, dodając 90 cm³ roztworu soli fizjologicznej NaCl do 10 g próbki kiszonki i homogenizowano go przez 10 min. Liczebność grzybów pleśniowych i drożdży oznaczano metodą płytkową z kolejnych rozcieńczeń roztworu na podłożu bakteriologicznym

OGYE Agar (Oxoid). Płytki inkubowano przez 5 dni w temperaturze 25°C. Bakterie fermentacji mlekowej oznaczano na MRS Agar (Oxoid), czas inkubacji wynosił 24-72 h w temperaturze 37°C w środowisku z CO₂ o stężeniu 5%. *Clostridium* oznaczano na TSC Agar (Merck) z dodatkiem D-cykloseryny, czas inkubacji wynosił 18-24 h w temperaturze 37°C w warunkach beztlenowych (Anaerocult® A). *Enterobacteriaceae* oznaczano na Chromocult Coliform Agar (Merck), czas inkubacji wynosił 24 h w temperaturze 37°C.

Wymazy pobrane z pysków i odbytów krów posłużyły za źródło bakterii patogennych. Wstępnej identyfikacji dokonano za pomocą posiewu na podłożach selekcyjnych (XLT4, Mac Conkey), w wyniku czego uzyskano pojedyncze kolonie. Z kolonii po 24 h hodowli w temperaturze 37°C na pożywce LB izolowano DNA (stosując Genelute Bacterial Genomic DNA Kit®) służące za matrycę do reakcji PCR.

Następnie przeprowadzono reakcję PCR, stosując odpowiednie startery dla bakterii z rodzaju *Shigella* spp., *Salmonella* spp. i *E. coli*. Mieszanina reakcyjna o objętości 25 µl zawierała: 2 µl DNA bakteryjnego, 5 µl buforu do PCR, po 0,25 mM każdego z dATP, dTTP, dCTP, dGTP, po 5 pM każdego ze starterów, 0,9 U polimerazy Taq. Całość uzupełniono wodą do 25 µl. Zastosowano uniwersalne warunki reakcji dla starterów amplifikujących fragment genu ipaH *Shigella* (sekwencja starterów: starter Shi-1 5'- CTT GAC CGC CTT TCC GAT AC -3', starter Shi-2 5'- CAG CCA CCC TCT GAG AGT A -3', produkt 610 pz), fragment genu invA *Salmonella* (sekwencja starterów: starter Sall-1 5'- TAT CGC CAC GTT CGG GCA A -3', starter Sall-2 5'- TCG CAC CGT CAA AGG AAC C -3', produkt 275 pz) i fragment promotora malB *E. coli* (starter E.col-1 5'- GAC CTC GGT TTA GTT CAC AGA -3', starter E.col-2 5'- CAC ACG CTG ACG CTG ACC A -3', produkt 585 pz). Warunki reakcji opracowano na podstawie WANGA i IN. (1997). Denaturację wstępną przeprowadzono w czasie 15 s w temperaturze 94°C, następnie przeprowadzono 35 cykli reakcji, które obejmowały: denaturację DNA przez 3 s w temperaturze 94°C, przyłączanie starterów przez 10 s w temperaturze 50°C, elongację DNA przez 35 s w temperaturze 74°C. Syntezę DNA kończono, inkubując próbki w temperaturze 74°C przez 2 min i w temperaturze 45°C przez 2 s.

Produkty reakcji PCR rozdzielano elektroforetycznie w 2-procentowym żelu agarozowym zawierającym bromek etydyny (w stężeniu 1 µg·ml⁻¹). Zidentyfikowane bakterie stanowiły źródło murawek (płytką agarową z LB), na których badano właściwości antagonistyczne mikroflory zawartej w kiszonce z 'Sucrosorgo 506'. Bakterie z kiszonki hodowano w standardowej pożywce LB w temperaturze 37°C przez 24 h. Następnie, stosując metodę kolejnych rozcieńczeń, uzyskano na płytkach z pożywką MRS Agar pojedyncze kolonie bakterii mlekowych. Potencjał antagonistyczny wybranych kolonii wobec bakterii patogennych analizowano metodą studzienkową zgodnie z procedurą podaną przez KRASZEWSKĄ i IN. (2005). Na płytkę wylewano 20 ml podłoża (1,5-procentowy agar) zaszczepionego wcześniej 24-godzinną hodowlą bakterii używanych jako wskaźnikowe (200 µl). Płytki hodowano przez 24 h w temperaturze 37°C. Następnego dnia w murawce wycinano studzienki o średnicy 11 mm. Na dno studzienki wprowadzano 100 µl agaru o stężeniu 1%, a następnie 100 µl 24-godzinnej hodowli szczepu antagonistycznego. Studzienkę zamykano, dodając ponownie 100 µl 1-procentowego agaru. Po 24 h inkubacji w 37°C obserwowano strefy zahamowania wzrostu organizmu patogennego. Identyfikacji szczepu antagonistycznego dokonano metodą mikrobiologiczną, na MRS Agar oraz molekularną, izolując DNA bakteryjne (otrzyma-

ne z pojedynczych kolonii), a następnie przeprowadzając reakcję PCR ze starterami specyficznymi dla fragmentu 16s RNA bakterii mlekowych *Lactobacillus brevis* (F.Lb-1 5'- GGA GTC AGC CGT CTA AGG TG -3', R.Lb-2 5'- ACG CAG TTG GTT T -3'). Warunki reakcji PCR: denaturacja wstępna – 94°C przez 10 min, denaturacja – 94°C przez 15 s, następnie 35 cykli reakcyjnych obejmujących przyłączenie starterów w temperaturze 52°C przez 30 s, elongację DNA w temperaturze 74°C przez 60 s, syntezę DNA w temperaturze 74°C przez 5 min. Wielkość uzyskanego produktu wynosiła 235 pz.

Wyniki

Skład chemiczny kiszonki z 'Sucrosorgo 506' przedstawiono w tabeli 1. Uzyskane wyniki wskazują na zwiększoną zawartość cukrów oraz małą zawartość suchej masy w porównaniu z wynikami uzyskanymi przez SELWETA (2010).

Tabela 1. Skład chemiczny kiszonki z 'Sucrosorgo 506' oznaczony zgodnie z AOAC (OFFICIAL METHODS... 2001)

Table 1. Chemical composition of 'Sucrosorgo 506' silage determined in accordance with AOAC (OFFICIAL METHODS... 2001)

Sucha masa (g·kg ⁻¹)	Cukry redukujące (g·kg ⁻¹ s.m.)	Kwas mlekowy (g·kg ⁻¹ s.m.)	Kwas octowy (g·kg ⁻¹ s.m.)	Kwas masłowy (g·kg ⁻¹ s.m.)	Etanol (g·kg ⁻¹ s.m.)	Białko ogólne (g·kg ⁻¹ s.m.)	pH
297 ±1,01	137 ±1,05	4,17 ±1,31	0,93 ±0,23	0,00	1,50 ±0,18	51 ±1,01	4,11 ±0,01

Analiza mikrobiologiczna kiszonki dotyczyła określenia liczebności grzybów pleśniowych, drożdży, bakterii fermentacji mlekowej i *Enterobacteriaceae* (tab. 2). Wynik reakcji PCR potwierdził obecność bakterii potencjalnie patogennych: *Shigella* spp., *Salmonella* spp. i *E. coli* w badanym materiale. Wynikiem wzajemnych oddziaływań pomiędzy bakteriami patogennymi a bakteriami obecnymi w kiszonce były strefy zahamowania wzrostu bakterii chorobotwórczych (tab. 3). Bakterie znajdujące się w kiszonce z 'Sucrosorgo 506' wykazywały znaczny antagonizm w stosunku do bakterii *Shigella* spp. i *Salmonella* spp., natomiast w przypadku bakterii *E. coli* nie obserwowano obecności stref zahamowania wzrostu.

Tabela 2. Oznaczenie grzybów pleśniowych, drożdży, bakterii fermentacji mlekowej i *Enterobacteriaceae* w kiszonce z 'Sucrosorgo 506'

Table 2. Determination of mould fungi, yeasts, lactic acid bacteria and *Enterobacteriaceae* in silage from 'Sucrosorgo 506'

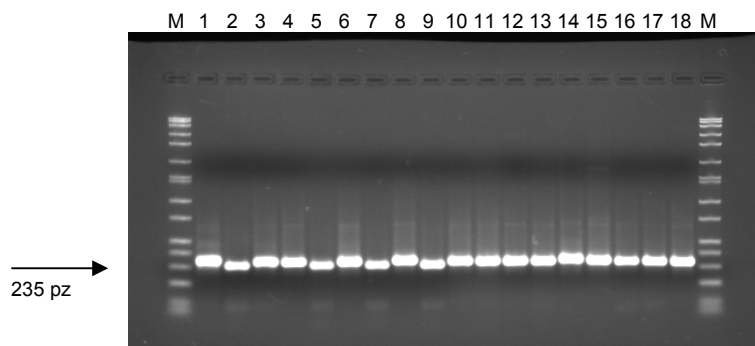
Pleśnie (jtk 10 ² w 1 g s.m.)	Drożdże (jtk 10 ⁴ w 1 g s.m.)	Bakterie mlekowe (jtk 10 ⁵ w 1 g s.m.)	<i>Enterobacteriaceae</i> (jtk 10 ³ w 1 g s.m.)
5,11 ±0,75	4,61 ±1,02	32,03 ±1,13	4,01 ±1,01

Galbas M., Selwet M., Dullin P., Porzucek F., Skrzypczak W., 2010. Interakcje występujące pomiędzy mikroorganizmami w kiszonkach z sorgo a bakteriami wyizolowanymi z pysków i odczynników krwi. *Nauka Przyr. Technol.* 4, 6, #77.

Tabela 3. Średnie strefy zahamowania wzrostu bakterii patogennych w kiszonce z ‘Sucrosorgo 506’ (mm)

Powtórzenia	<i>Shigella</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Escherichia coli</i>
7/47	13	7	0
7/62	12	7	0
7/65	8	12	0

Dokonano metodą PCR identyfikacji bakterii wykazujących właściwości antagoniczne w stosunku do *Shigella* spp. i *Salmonella* spp. Uzyskano produkt reakcji amplifikacji wynoszący 235 pz, charakterystyczny dla bakterii mlekowej *L. brevis* (rys. 1).



Rys. 1. Elektroforeza produktu reakcji PCR z zastosowaniem starterów Lb-1/Lb-2 w 2-procentowym żelu agarozowym; M – marker ciężaru, tor 1-18 – kolejne próby

Fig. 1. Electrophoresis of PCR products using primers set Lb-1/Lb-2 in 2% agarose gel; M – molecular size marker, tracks 1-18 – successive attempts

Zidentyfikowane szybko metodą PCR bakterie mlekowe *L. brevis* przeważały w kiszonce z ‘Sucrosorgo 506’ i wykazywały właściwości antagonistyczne w stosunku do bakterii patogennych – *Shigella* spp. i *Salmonella* spp., natomiast w stosunku do bakterii *E. coli* nie zaobserwowano tego typu oddziaływań (tab. 3).

Dyskusja

Według badań MACHULSKIEGO i KSIĘŻAKA (2004) sorgo, ze względu na obfity plon zielonej masy, dużą odporność na wyleganie, dużą zawartość cukrów rozpuszczalnych i tolerancję na wyższe temperatury, nadaje się jako roślina paszowa uzupełniająca w stosunku do kukurydzy. Według KOZŁOWSKIEGO i IN. (2009) jego wartość żywieniowa stanowi około 80-90% wartości kukurydzy. Sorgo cukrowe (‘Sucrosorgo 506’), poddane analizie w tej pracy, jest wartościową rośliną paszową podawaną zwierzętom

w stanie świeżym lub zakiszczonym. Wyniki analizy chemicznej potwierdzają, że pasza ma dobre wartości pokarmowe, odznacza się dużą zawartością cukrów rozpuszczalnych w wodzie, natomiast niekorzystną cechą jest mała zawartość suchej masy. BARBANTI i IN. (2006) uważają, że przyczyną małego stężenia składników pokarmowych w kiszonce jest niewielki udział owocostanów w plonie. Ogólna analiza mikrobiologiczna kiszonki wykazała obecność grzybów pleśniowych, drożdży, bakterii fermentacji mlekowej i *Enterobacteriaceae* w dopuszczalnych przez AOAC (OFFICIAL METHODS... 2001) normach. Bakterie potencjalnie patogenne bytują u zwierząt w prawidłowych stanach fizjologicznych. Wyjątek stanowią bakterie *Shigella* spp., które zasiedlają głównie organizm ludzki i wyższych naczelnymi, ich obecność u bydła może być związana z zanieczyszczeniami gleby, np. odchodami. Bakterie *Shigella* spp., *Salmonella* spp. i *E. coli* stanowiły organizmy wskaźnikowe służące do identyfikacji właściwości antagonistycznych. Badania dowiodły powstania stref zahamowania wzrostu bakterii patogennych w przypadku *Shigella* i *Salmonella*, nie zaobserwowano natomiast takiego efektu w przypadku *E. coli*. Analiza mikrobiologiczna i molekularna z zastosowaniem odpowiednich starterów charakterystycznych dla 16s RNA bakterii mlekowych wykazała, że *L. brevis* jest bakterią mającą hamujący wpływ na wzrost bakterii patogennych.

Bakterie *L. brevis* należą do bakterii heterofermentatywnych, produkujących kwas mlekowy, CO₂, etanol i kwas octowy. W badanej kiszonce (bez inokulantów) bakterie te zdominowały pozostałe bakterie mlekowe, co ma korzystny wpływ na jakość kiszonki, jej właściwości zdrowotne (zwłaszcza że są one stosowane jako probiotyki) oraz stabilizację w warunkach tlenowych.

Wnioski

1. Kiszonka z 'Sucrosorgo 506' ma dobre parametry organiczne, a mała zawartość suchej masy ułatwia zakiszczanie.
2. W badanych kiszonkach z 'Sucrosorgo 506' przeważały bakterie z heterofermentatywnego gatunku *Lactobacillus brevis*, mające właściwości prozdrowotne.
3. Bakterie *Lactobacillus brevis* wykazywały właściwości antagonistyczne w stosunku do patogenów wyizolowanych z pysków i odbytów krów.
4. Najsilniejsze zahamowanie wzrostu względem *Lactobacillus brevis* oznaczono w przypadku *Shigella* spp., a mniejsze – w przypadku *Salmonella* spp.
5. *Lactobacillus brevis* nie hamował wzrostu *Escherichia coli*.

Literatura

- BARBANTI L., GRANDI S., VECCHI A., VENTURI G., 2006. Sweet and fibre sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], energy crops in the frame of environmental protection from excessive nitrogen loads. *Eur. J. Agron.* 25: 30-39.
- BOLSEN K.K., MOORE K.J., COBLENTZ W.K., SIEFERS M.K., WHITE J.S., 2003. Sorghum silage. W: *Silage science and technology*. Red. D. Buxton, R. Muck, J. Harrison. *Agronomy* 42: 609-632.
- KOZŁOWSKI S., ZIELEWICZ W., POTKAŃSKI A., CIEŚLAK A., SZUMACHER-STRABEL M., 2009. Effect of chemical composition of sugar sorghum and the cultivation technology on its utilization for silage production. *Acta Agron. Hung.* 57: 67-78.

Galbas M., Selwet M., Dullin P., Porzucek F., Skrzypczak W., 2010. Interakcje występujące pomiędzy mikroorganizmami w kiszonkach z sorgo a bakteriami wyizolowanymi z pysków i odbytów krów. *Nauka Przyr. Technol.* 4, 6, #77.

KRASZEWSKA J., WZOREK W., SZTANDO E., RACZYŃSKA-CABAJ A., 2005. Aktywność antagonizująca bakterii fermentacji mlekowej z gatunku *Lactobacillus plantarum*. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 4: 39-52.

MACHULSKI M., KSIĘŻAK J., 2004. Ocena poziomu plonowania sorgo w zależności od sposobu siewu i poziomu nawożenia azotem. Sprawozdanie z badań IUNG Puławy. [<http://www.nk.com/media/92850/sorgo%20iung>].

MICHALSKI T., 2009. Sorgo – nowa roślina energetyczna. [<http://www.dsvpoznau.eu/doc/sorgo-en-autor-prof-michalski-dla-dsv-poznan.pdf>].

OFFICIAL METHODS of analysis. 2001. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC. ROLNICZY MAGAZYN ELEKTRONICZNY. 2008. Nr 28. [http://www.cbr.edu.pl/rme28/dane/8_4.html].

SELWET M., 2010. Skład chemiczny i mikroflora kiszonki z sorgo zakiszanej z dodatkiem biologicznym. *Ekol. Tech.* 3: 138-142.

WANG R.F., CAO W.W., CERNIGLIA C.E., 1997. A universal protocol for PCR detection of 13 species of footborne pathogens in foods. *J. Appl. Microbiol.* 83: 727-736.

INTERACTIONS OCCURRING BETWEEN MICROORGANISMS IN SORGHUM SILAGE AND BACTERIA ISOLATED FROM COWS MOUTHS AND RECTUMS

Summary. Being a short day plant, in Polish climatic conditions, sorghum does not produce mature seeds, although it yields high forage harvest and, therefore, plans are made to utilise this plant as maize substitute. The aim of the performed analyses was to assess chemical composition and antagonistic properties of microorganisms present in the silage of ‘Sucrosorgo 506’ against potentially pathogenic bacteria occurring in the mouths and rectums of cows. Chemical composition was determined in accordance with AOAC requirements. In addition, occurrence of mould fungi, yeasts, lactic fermentation bacteria and *Enterobacteriaceae* was investigated. The performed analyses of antagonistic properties revealed the presence of inhibition zones in the case of pellicle from *Shigella* spp. and *Salmonella* spp. bacteria. No growth inhibition zones were observed against *Escherichia coli*. The main microorganisms which exhibited antagonistic properties were lactic bacteria of *Lactobacillus brevis*.

Key words: antagonism, pathogenic bacteria, lactic bacteria, PCR, growth inhibition zones

Adres do korespondencji – Corresponding address:

Mariola Galbas, Katedra Biochemii i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wołyńska 35, 60-637 Poznań, Poland, e-mail: mariolagalbas@gmail.com

Zaakceptowano do druku – Accepted for print:

18.10.2010

Do cytowania – For citation:

Galbas M., Selwet M., Dullin P., Porzucek F., Skrzypczak W., 2010. Interakcje występujące pomiędzy mikroorganizmami w kiszonkach z sorgo a bakteriami wyizolowanymi z pysków i odbytów krów. *Nauka Przyr. Technol.* 4, 6, #77.