

EFFECT OF ADDITION OF SOIL ON MICROBIOLOGICAL INDICATORS OF ALFALFA SILAGE (*MEDICAGO SATIVA*)

VLIV PŘÍDAVKU PŮDY NA MIKROBIOLOGICKÉ UKAZETELE SILÁŽÍ VOJTĚŠKY SETÉ

Mlejnková V., Fröhdeová M., Lukešová K., Alba Mejía J.E., Kalhotka L., Doležal P.

Department of Animal Nutrition and Forage Production, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: veronika.mlejnkova@mendelu.cz

ABSTRACT

The present work deals with the influence of the addition of soil microbiological analysis of experimental silages of alfalfa (*Medicago sativa*, var. *Palava*). In the manufacture of experimental silages were contaminated deliberately with soil alfalfa in amounts of 0, 20 and 40 g/kg dry matter. Subsequently, the model of silage has made in different varieties and always in three repetitions. The experimental containers were removed and analyzed pooled sample.

The microbiological analyzes were observed number of colonies of clostridia, lactic acid bacteria, total plate count, amount of bacteria of the family *Enterobacteriaceae*, moulds and yeasts. After statistical evaluation, it was found that the addition of soil between the versions (K, K20, K40) has not been shown statistically ($P < 0.05$) at any of the studied microorganism.

Key words: soil, microorganism, yeasts, moulds, Lactic Acid Bacteria (LAB), clostridia

Acknowledgments: The study was supported by an internal grant project (IGA) No. IP 2/2012 "The risk incidence of clostridia in silage."

ÚVOD

Vojtěška setá je významnou bílkovinnou píceinou. Vyznačuje se nejen vysokými výnosy sušiny, ale i vyšším obsahem dusíkatých látek, vitamínů, vápníku, hořčiku a beta – karotenů v porovnání s ostatními zemědělskými píceinami. Je jedním z hlavních i nejlevnějších zdrojů rostlinných bílkovin v krmných dávkách všech býložravců (DOLEŽAL, 2012). Využívá se pro zkrmování, konzervaci silážováním nebo pro výrobu sena (PADRŮNĚK, 2004). Vojtěška setá se řadí z hlediska výživy zvířat mezi objemná statková krmiva šťavnatého charakteru. Patří do skupin jetelovin, které jsou hlavním zdrojem rostlinných bílkovin s vysokou biologickou hodnotou a stimulačním mlékotvorným účinkem (ZEMAN a kol., 2006).

Kvalitní siláže vznikají konzervací čerstvé nebo zavadlé píce především mléčným kvašením nebo konzervací píce pomocí silážních aditiv. Jsou mírně nakyslá či kyselá šťavnatá krmiva, které se vyznačují příjemnou aromatickou vůní po původní surovině, ze které byla vyrobena (LOUČKA, 1998). Zdravotní nezávadnost siláží můžeme hodnotit pomocí smyslového posouzení a kvality fermentačního procesu. Fermentaci siláží ovlivňují různé druhy mikroorganismů, u kterých je možno stimulovat nebo brzdit jejich aktivitu.

Mikroflóru v silážích můžeme z mikrobiologického hlediska rozdělit na žádoucí (prospěšnou) a nežádoucí. Do nežádoucí mikroflóry řadíme mikroorganismy, které se podílejí na kažení siláže za aerobních podmínek, což jsou kvasinky, plísně a listerie. Nebo za anaerobních podmínek - klostridie a enterobakterie. Mezi žádoucí mikroorganismy řadíme bakterie mléčného kvašení (DRIEHUIS; ELFERINK, 2000).

MATERIÁL A METODIKA

V modelovém experimentu se použila vojtěška setá (*Medicago sativa*, var. *Palava*). Byla získána z první seče z pokusných parcel a krátce zavadnuta na sušinu 33 %. Byl založen modelový pokus, kde sledovaným faktorem byl přírůstek půdy, a to v dávkách 0, 20 a 40 g/kg sušiny hmoty. Dávky přidávané půdy byly navrženy s ohledem na předpokládaný obsah popelovin v původní hmotě (okolo 8 %/kg sušiny) a na záměr, aby obsah popelovin v kontaminovaných silážích přesahoval 10 %, což je v praxi považováno za hraniční hodnotu obsahu popelovin.

V pokusu byly použity celkem tři varianty siláží vždy ve třech opakováních. Jednalo se o kontrolní variantu bez přírůvku půdy (K) – vzorky č. 1 až 3. Kontrolu s přírůvkem půdy v množství 20 g/kg sušiny původní hmoty (K20) – vzorky č. 4 – č. 6 a kontrolu s přírůvkem půdy v množství 40 g/kg sušiny hmoty (K40) – vzorky č. 7 – č. 9.

Takto připravená hmota o hmotnosti 6 kg byla udusána do speciálních silážních nádob, jejichž konstrukční řešení umožňuje hermetické uzavření a stálé zatížení silážované hmoty. Modelové

siláže byly po dobu 8 týdnů uskladněny v laboratoři o průměrné laboratorní teplotě 24 – 26 °C. Po otevření silážních nádob byl z každé varianty odebrán reprezentativní vzorek na mikrobiologickou analýzu.

Pro stanovení sulfidredukcujících klostridií (*Clostridium perfringens*) byl použit TSN agar a inkubace probíhala při 46 °C po dobu 24 h. Pro počet bakterií mléčného kvašení (BMK) byl použit MRS agar (Biokar Diagnostics, France), inkubace probíhala při 30 °C 72 h. Pro celkový počet mikroorganismů (CPM) bylo použito jako kultivačního média PCA agar, inkubace probíhala při 30 °C po dobu 72 hodin. U bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* byl použit VRBG agar, inkubace probíhala při 37 °C po dobu 24 h. Pro stanovení kvasinek a plísní byl použit Chloramphenicol glucose agar, inkubace probíhala 120 h při 25 °C. Po inkubaci byly z Petriho misek odečteny narostlé kolonie a výsledky analýz byly vyjádřeny v CFU na gram siláže.

Výsledky byly statisticky zpracovány metodou analýzy variace a rozdíly mezi jednotlivými skupinami byly analyzovány Scheffeho testem v programu Statistica 10. Byly sledovány rozdíly mezi všemi variantami bez přídavku i s přídavkem půdy. Pokud jsou v tabulce uvedeny shodné indexy, pak nebyl po vyhodnocení výsledků statisticky průkazný rozdíl ($P < 0,05$). Jsou-li indexy odlišné, byl prokázán statisticky průkazný rozdíl ($P < 0,05$). Data jsou v textu prezentována jako průměr \pm směrodatná odchylka (dále jen sm.od.).

VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem experimentu bylo zjistit pomocí mikrobiologické analýzy vliv přídavku půdy na výskyt klostridií v pokusných silážích. Do pokusu byly zahrnuty kromě klostridií i bakterie mléčného kvašení, celkový počet mikroorganismů, bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*, plísně a kvasinky.

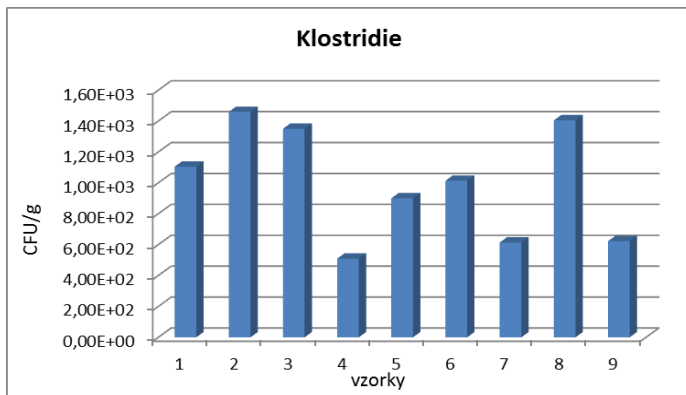
Přídavek půdy neměl vliv na zvýšení počtu klostridií v silážích. Mezi jednotlivými variantami (K, K20 a K40) nebyl statistický průkazný rozdíl ($P < 0,05$) (tab. 1).

Tab. 1: Klostridie

varianta	průměr \pm sm.od.	indexy
K	1,30E+03 \pm 1,48E+02	a
K20	8,08E+02 \pm 2,16E+02	a
K40	8,80E+02 \pm 3,71E+02	a

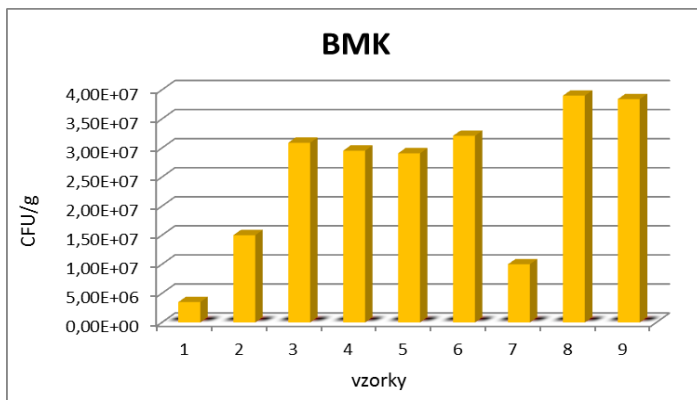
V grafu 1 jsou uvedeny počty kolonií klostridií, které dosahovaly maximální koncentrace do $1,5 \cdot 10^3$ CFU/g. Dle ZEMANA a kol. (2006) je kvalita siláže velmi dobrá, pokud počty spor klostridií v 1 g siláže jsou do 5000.

Graf 1: Klostrídie



DOLEŽAL a kol. (2006) uvádí, že bakteriím mléčného kvašení v silážní hmotě konkurují kvasinky. Nejvyšší počty kolonií bakterií mléčného kvašení byly řádově 10^7 CFU/g (graf 2). U BMK obecně platí, že čím vyšší obsah těchto bakterií, tím je usnadněn proces primární fermentace.

Graf 2: Bakterie mléčného kvašení



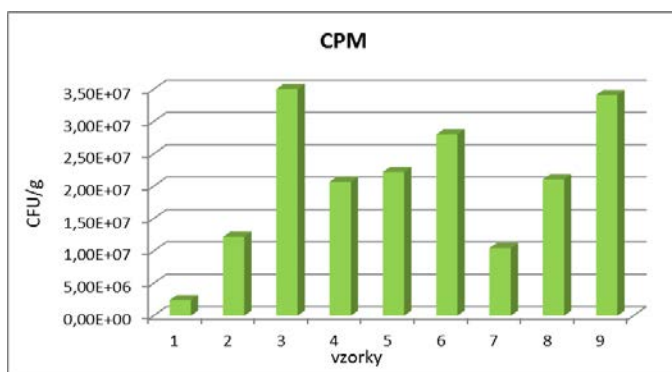
U bakterií mléčného kvašení nebyl prokázán statisticky průkazný rozdíl ($P < 0,05$) mezi variantami K, K20 a K40 (tab. 2).

Tab. 2: BMK

varianta	průměr ± sm.od.	indexy
K	1,65E+07 ± 1,12E+07	a
K20	3,02E+07 ± 1,32E+06	a
K40	2,91E+07 ± 1,35E+07	a

Celkový počet mikroorganismů se řádově pohyboval do 10^8 CFU/g u neošetřené varianty (K), s přidavkem půdy 20 a 40g/kg sušiny hmoty (graf 3). Tato skupina mikroorganismů byla stanovována pro zjištění celkové úrovně mikrobiálního osídlení siláží.

Graf 3: Celkový počet mikroorganismů

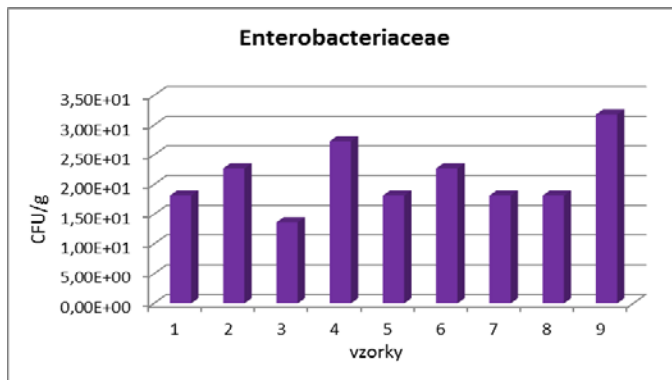


U celkového počtu mikroorganismů nebyl statisticky průkazný rozdíl po přidavku půdy (tab. 3).

Tab. 3: CPM

varianta	průměr ± sm.od.	indexy
K	1,67E+07 ± 1,38E+07	a
K20	2,36E+07 ± 3,16E+06	a
K40	2,19E+07 ± 9,67E+06	a

Bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* se ve vzorcích vyskytovaly jen v nepatrném množství (graf 4). Tyto bakterie indikují fekální znečištění siláží.

Graf 4: Bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*

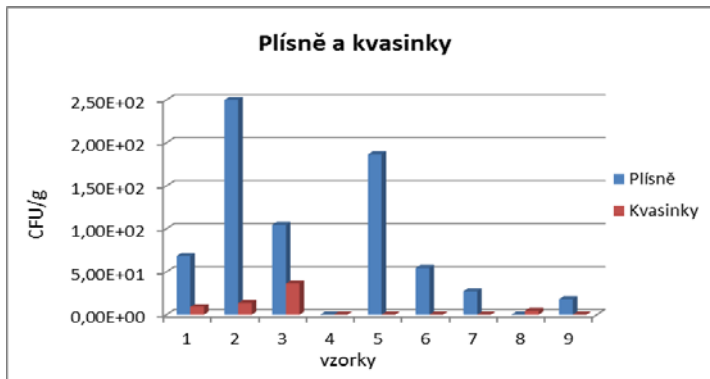
U bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* nebyl statisticky průkazný rozdíl ($P < 0,05$) mezi jednotlivými variantami (tab. 4).

Tab. 4: Bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*

varianta	průměr ± sm.od.	indexy
K	1,82E+01 ± 3,71E+00	a
K20	2,27E+01 ± 3,71E+00	a
K40	1,82E+01 ± 0,00E+00	a

Zdravotním i nutričním problémem v silážích jsou plísňe, které patří mezi nežádoucí mikroorganismy. Signalizují nízkou hygienu a špatné skladovací podmínky. V současné době zatím nejsou zavedeny limity na přípustné množství plísní a kvasinek. Dle ZEMANA a kol. (2006) se všeobecně považuje za ještě vyhovující koncentrace plísní do 10^5 CFU/g, ale zpravidla jsou krmiva považována za zkažená a nezkrmitelná, pokud je koncentrace plísní vyšší než 10^6 či 10^7 CFU/g. Toto potvrzuje rovněž MUDŘÍK a kol. (2006). Vzorky pokusných siláží nebyly viditelně zaplísňené. Maximální počet plísní byl řádově do 10^3 CFU/g (graf 5). Uvedená hodnota vyhovuje hygienické kvalitě pokusných siláží. Kvasinky jsou považovány za hlavní příčinu aerobní nestability siláží. K zahřívání siláží dochází při činnosti kvasinek a zvýšení jejich koncentrace nad 10^7 či 10^8 CFU/g. Limity počtu kvasinek by měly dle ZEMANA a kol. (2006) dosahovat maximální koncentrace do 10^4 CFU/g. Maximální hodnoty kvasinek (graf 5) dosahovaly řádově do 10^1 CFU/g.

Graf 5: Plísňe a kvasinky



U kvasinek se zvyšujícím se množstvím přidané půdy se počet kvasinek snižoval (tab. 5), ale nebyl mezi jednotlivými variantami prokázán statisticky průkazný rozdíl ($P < 0,05$). U plísňí také nebyl prokázán statisticky průkazný rozdíl (tab. 5).

Tab. 5: Plísňe a kvasinky

mikroorganismus	varianta	průměr ± sm.od.	indexy
plísňe	K	1,42E+02 ± 8,07E+01	a
	K20	8,03E+01 ± 7,82E+01	a
	K40	1,36E+01 ± 1,36E+01	a
kvasinky	K	1,97E+01 ± 1,19E+01	a
	K20	0,00E+00 ± 0,00E+00	a
	K40	1,52E+00 ± 2,14E+00	a

ZÁVĚR

U kvasinek se zvyšujícím se množstvím půdy klesaly jejich počty, ale nebyl statisticky průkazný rozdíl. Bylo potvrzeno, že vliv přídatků půdy v množství 0, 20 a 40 g/kg sušiny hmoty nebyl mezi jednotlivými variantami (K, K20, K40) u žádného mikroorganismu statisticky prokázán ($P < 0,05$).

LITERATURA

- Doležal, P. a kol. (2012): Konzervace krmiv a jejich využití ve výživě zvířat. Mendelova univerzita v Brně, Vydavatelství Baštan: 183.
- Doležal, P. (2006): Konzervace, skladován a úpravy objemných krmiv (Přednášky), 1. vyd., MZLU, Brno, 247 s.
- Driehuis, F., Elferink SJWH. (2000): Wet. Quart 22, 212 - 217 s.
- Loučka, R. (1998): Charakteristika kukuřice jako krmiva. Kukuřice. Kněževes: VP AGRO, s. 110 - 114.
- Mudřík, Z., a kol. (2006): Základy moderní výživy skotu, Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha, 270 s.
- Padrůněk, S., Drevjani, L., Kozel, V. (2004): Holštýnský svět, 1. vyd., UNIPRESS Turnov: 168 - 179.
- Zeman, L. a kol. (2006): výživa a krmení hospodářských zvířat, 1. Vyd., Profi Press s.r.o.: 104 - 105.