

**SILÓZÁS SORÁN TÖRTÉNŐ ERJEDÉSI FOLYAMATOK ÉS AZ
EBBEN SZEREPET JÁTSZÓ STRUKTURÁLIS SZÉNHIDRÁTBONTÓ
MIKROBIÁLIS KÖZÖSSÉGEK**

**STUDY OF FERMENTATION PROCESSES AND STRUCTURAL
POLISACCHARIDE DEGRADING BACTERIAL CONSORTIA FROM
DIFFERENT TYPE OF SILAGES**

BECZE ANNAMÁRIA

Bukaresti Műszaki Egyetem, Bukarest, Románia

marcsa90@yahoo.com

Abstract

A silózás a takarmánynövények tartósításának az a folyamata amely során anaerob körülmények között a tejsavbaktériumok a vízdékony szénhidrátokat szerves savakra bontják. A kutatás célja különböző típusú silók mikrobiális közösségének vizsgálata volt. A kutatás során a három típusú silóból (kukorica, lucerna és szenázs) összesen 190 baktérium izolátumot sikerült izolálni, amelyből 55 törzset szelektáltunk jótékony tulajdonságaik alapján, amelyek 19 fajhoz tartoznak. A silókból izolált baktériumtörzsek a következő génuszokhoz tartoztak: *sp.*, *Paenibacillus sp.*, *Arthrobacter sp.*, *Micrococcus sp.* și *Weissella sp.* Az izolált, szelektált és jellemzett baktériumtörzsek alkalmazhatók a silózást elősegítő biopreparátumok előállításánál.

Kulcsszavak: siló, mikroorganizmus közösség, strukturális szénhidrát, biopreparátum

Bevezető

A silózás célja a takarmánynövények tartósítása azzal a céllal, hogy a benne lévő tápanyagok és vitaminok minél nagyobb arányban megmaradjanak. A silózás során előállított takarmányt az állatok ellátására használják. Az így előállított takarmány hosszabb ideig tartós marad, mint a más típusú takarmányok. Silózásra csak az 50-60%-os nedvességtartalmú növényi anyag alkalmas, a magasabb víztartalmú növényeket a silózási folyamat előtt fonnyasztani kell a kívánt nedvességtartalom eléréséig. Silózás előtt a növényi anyagot szükséges aprítani, amelyet a silótérbe behordva tömörítenek, majd légmentesen lezárnak.

Az erjedési folyamat lényege, hogy az aprított növény vagy növényi részekből a levegő minél tökéletesebb kiszorítása következtében kialakuló anaerob körülmények között a tejsavas erjesztő mikroorganizmusok gyorsan, nagymértékben elszaporodjanak, anyagcseréjüknek köszönhetően elősegítve a tartósítási folyamatot és növelve a lebontható tápanyagtartalmat (<http://www.agraroldal.hu/kukorica-9.html>). Fontos a silózás során keletkező takarmány vízzoldható szénhidrát és szárazanyagtartalma (250-400 g/kg) amelyet nagy mennyiségben kell tartalmazzon (Mohd-Setapar et al., 2012).

Egyes európai országokban, mint Hollandia, Németország és Dánia olyan takarmánynövényeket mint a kukorica, fűfélék, zöldségfélék és búza 90%-ban silózzák a termelés helyén. Ez a technika biztonságos, környezetbarát, és természetes termékként tartják számon (Mohd-Setapar et al., 2012).

Romániában a takarmánynövények termesztését tekintve zöldtakarmányt 2007-2012 között 210-230 ezer ha területen termesztettek, ahol összesen 2200-3350 millió tonna termést értek el, míg lucernát és lóherét 560-660 ezer ha területen termesztettek, ahol összesen 7330-10660 millió tonna termést regisztráltak (Román Statisztikai Évkönyv, 2013). Nem találtunk szakirodalmi adatokat, hogy ezen növényeket milyen mértékben tartósítják silózással Romániában.

A siló mikrobiótája kulcsszerepet játszik a sikeres tartósítási folyamatban. Ezen mikrobióta hatásukat tekintve két nagyobb csoportba sorolható: jótékony és káros mikroorganizmusokra. A jótékony mikrobák a tejsavbaktériumok, a károsak közé tartoznak különböző aerob (élesztők, penészek, bacilusok) vagy anaerob (klostridiumok, enterobaktériumok) mikroorganizmusok (Oude Elferink et al., 1999).

A fermentációban szerepet játszó jótékony mikroorganizmusok egyik csoportját a tejsavbaktériumok képezik. Ezen mikroorganizmusok jelenlétének köszönhetően csökken a növényi légzés és az enzim aktivitás, nő a tejsav és más szerves savak mennyisége, mely maga után vonja a közeg pH-jának csökkenésgátló hatást fejtve ki a nemkívánatos mikrobák ellen.

A másik baktériumcsoport, amely szereppel bír a silózási folyamatban a strukturális szénhidrát bontó mikroorganizmusok. Azon baktériumok tartoznak ide, amelyek a nagy molekulájú szénhidrátokat, mint például a cellulóz, hemicellulóz (xilán), lignin és pektin képesek lebontani és kis molekulájú cukrokat szabadítanak fel, amit a tejsavbaktériumok anyagcseréjük során felhasználnak és tejsavat eredményeznek (Contreras-Govea et al, 2013).

Kutatásunk célja az volt, hogy megvizsgáljuk a székelőföldi silók mikroorganizmus közösségét különös tekintettel a strukturális szénhidrát bontó baktériumokra. A kutatás

során különböző típusú silók mikroorganizmus közösségét vizsgáltuk, azért, hogy a helyi körülményekhez alkalmazkodott jótékony hatású törzsek szelektálását követően Székelyföldön alkalmazható biopreparátum javaslatot tudjunk összeállítani.

Anyag és módszer

A vizsgált silók típusa, származása és a mintavételezés módja

A potenciális szénhidrátbontó baktériumtörzsek izolálását a következő típusú fermentált takarmányokból végeztük: szenázs, lucerna siló, kukorica siló. A három típusú silót egy csíkszentkirályi gazda bocsátotta rendelkezésünkre.

A mintavételezés a silóból, a siló megbontását követően steril mintavevővel, steril 100 ml-es üvegedénybe történt. A mintavétel a siló belsejéből történt, steril körülmények között, műanyag kesztyű segítségével, hogy elkerüljük a minta mikrobiális fertőzését. A mintát a feldolgozásig 4°C-on tároltuk, hűtőszekrényben.

A strukturális szénhidrátbontó törzsek izolálása

Az izolálni kívánt mikroorganizmusok esetében hígítási sort készítettünk 1 g minta valamint 9 ml fiziológiás só oldattal 10-2 hígításig, ezt követően a 10-1 valamint a 10-2 hígításokból 0,1 ml-et szélesztéssel oltottunk az előre elkészített szelektív táptalajok felületére. A táptalajok különböző szénforrásokat tartalmaztak: cellulózt, xilánt, karboximetil-cellulózt (CMC), pektint valamint fitátot.

A strukturális szénhidrátbontó baktériumok izolálása egy strukturális szénhidrátot tartalmazó tápagaron történt (cellulóz, CMC és xilán) amelyhez sókat és kongóvörös indikátort adtunk. A kongóvörös indikátor segítségével meghatároztuk a potenciális strukturális szénhidrátbontó törzseket, a telepek körül kialakult körgyűrű segítségével. Mivel a kongóvörös a strukturális szénhidrátokhoz kötődik, a világos körgyűrű (halo zóna) jelenléte a strukturális szénhidrát kioldását jelenti a baktérium telep körül.

A pektinbontás képességét is vizsgáltuk pektin tartalmú táptalajon. Ebben az esetben az alapszuspenzióból oltottunk le a táptalaj felületére. A fitátbontó képesség esetében, viszont Na-fitát tartalmú táptalajt készítettünk és ennek a felületére oltottunk le a 10-1 valamint a 10-2 hígításokból. Ezt követte az inkubálás szobahőmérsékleten 3-5 napig, aerob illetve anaerob körülmények között. Az anaerob körülményeket Anaerocult edényekben valósítottuk meg.

Az inkubálás után a kifejlődött telepeket felvettük és kiszélesztettük tiszta tenyészetek elérése céljából. A Petri csészéket 3-5 napig inkubáltuk szobahőmérsékleten, aerob vagy

anaerob módon. Az így kapott különálló telepeket Nutrient ferdeagarra oltottuk át, tiszta tenyészetekként

A strukturális szénhidrátbontó képességgel rendelkező baktériumtörzsek azonosítása

A baktérium törzsek azonosítása a fajra jellemző 16S rDNS szekvencia analízis alapján történik. A különböző szénforrásbontó képesség eredményét áttekintve, azokat a törzseket szelektáltuk ki, amelyek képesnek bizonyultak az adott szénforrásokat bontani. Ezeket a törzseket előneveltük Nutrient táplevesben, majd 12 órás tenyészetekből 1,5 ml lecentrifugáltunk steril Eppendorf tubusba DNS izolálás céljából. A genomi DNS izolálása az AccuPrep Genomic DNA Extraction Kit segítségével történt, követve a gyártó által megadott utasításokat. A DNS kivonás sikerességét agaróz gélelektroforézis segítségével ellenőriztük.

A bakteriális genomi DNS 16S rDNS szakaszát az univerzális 27f 5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3' és 1492r 5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT3' primerek segítségével szaporítottuk fel. Az 50 µl PCR reakcióelegy a következő összetevőket tartalmazta: 5 µl 10xPCR puffer, 2 µl dNTP, 4 µl MgCl₂, 4-4 µl R és F primer, 0,25 µl Taq polimeráz és 33,75 µl ultratiszta víz. A PCR reakció körülményei: 3 perc iniciális denaturálás 94°C, amelyet 30 ciklus követ, a következő szakaszokat foglalva magába 94°C (30 sec), 50°C (25 sec), and 72°C (2 min), végső elongáció 72°C (10 perc).

A felszaporított terméket az LGC Genomics céggel szekvenáltattuk meg. A szekvenciákat a Chromas és a MEGA 4 programok segítségével dolgoztuk fel, majd a kapott eredményeket összehasonlítottuk a GenBank-ban lévő szekvenciákkal. Egy százaléknál kisebb különbség esetén az EzTaxon rendszerben már meglévő szekvencia és az általunk vizsgált baktérium szekvencia között a baktérium izolátumainkat rendszertanilag besoroltuk.

Eredmények és tárgyalása

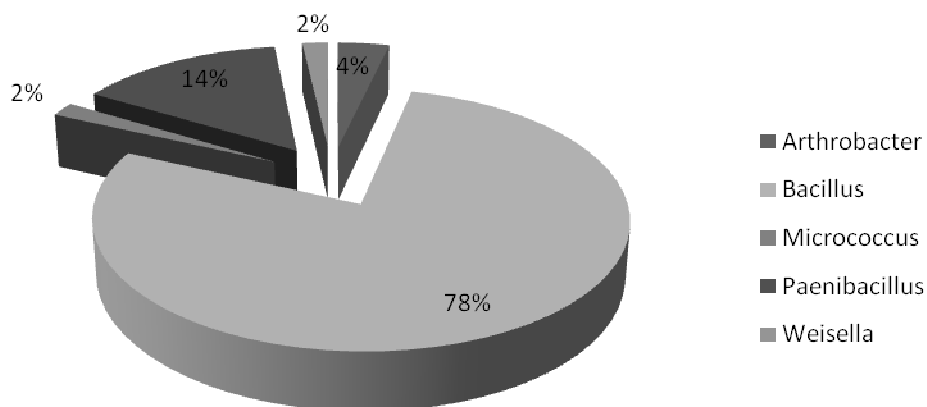
A strukturális szénhidrátbontó baktériumtörzsek izolálása és azonosítása

Munkánk során 190 baktérium izolátumot kaptunk. A különböző erjesztett takarmányokból izolált baktériumtörzsek izolálási körülményei aerob illetve anaerobok voltak. A legjobb tulajdonságokkal rendelkező baktériumtörzseket szelektáltuk, jellemeztük, és azonosítottuk molekuláris biológiai módszereket alkalmazva. Az 55 szelektált baktérium izolátum 19 különböző fajba tartozik. A három különböző siló típusból izolált baktériumfajok a következő nemzetségekbe sorolhatóak: *Bacillus* sp., *Paenibacillus* sp., *Arthro-*

bacter sp., Micrococcus sp. és Weissella sp.. A Székelyföldi silók strukturális szénhidrát bontó baktériumközösségét 78%-ban Bacillus sp. fajok alkotják, 14%-ban Paenibacillus sp. fajok, 4%-ban Micrococcus sp. fajok is megtalálhatóak, míg 2-2%-os arányban jelen vannak az Arthrobacter sp. és Weissella sp. fajok is (lásd 1 ábra).

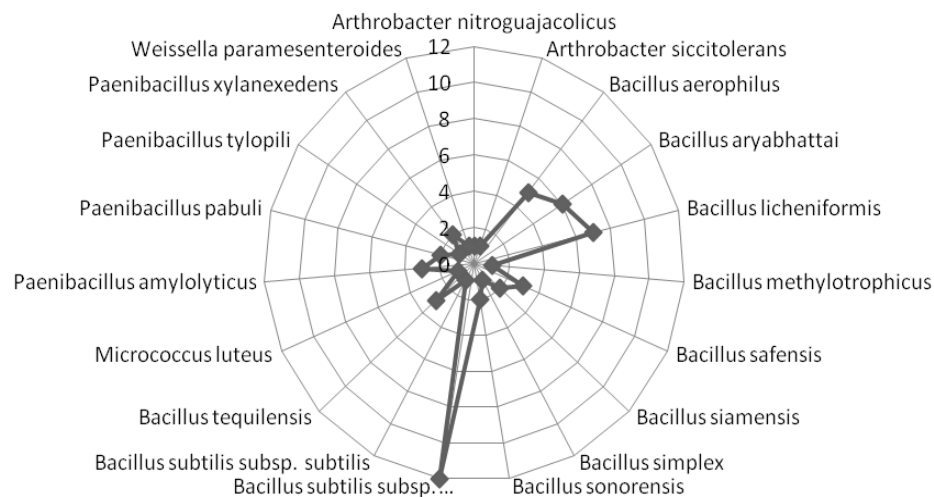
A siló mikrobiótájára vonatkozó szakirodalom mind a tejsav mind pedig a strukturális szénhidrát bontó baktériumokat is tárgyalja. Li-Nishino (2011) kukorica siló mikrobiótáját tanulmányozva a Lactobacillus plantarum, Enterococcus faecium, Lactobacillus acetotolerans, Lactobacillus panis, Lactobacillus buchneri, Stenotrophomonas maltophilia, Acetobacter pasteurianus törzsek mellett Bacillus sp. fajokat is izolált.

A kukorica silón végzett mikrobiológiai vizsgálatok eredményeként Dolci et al. (2011) több tejsavbaktérium mellett (Lactobacillus buchneri, Lactobacillus amylovorus, Lactobacillus plantarum) az Acetobacter pasteurianus és a Bacillus subtilis baktériumfajokat is azonosította.



1. ábra A különböző silókból izolált baktériumtörzsek nemzetségek szerinti eloszlása

A Bacillus törzsek aránya jóval meghaladja a más génuszokba tartozó törzsekét, amint azt az előző ábrán láthattuk. A Bacillus nemzetségen belül, a faji megoszlás tekintetében a Bacillus subtilis subsp. inaquosorum bizonyult a leggyakoribbnak amelyből összesen 12 izolátumot izoláltunk (lásd 2 ábra.).

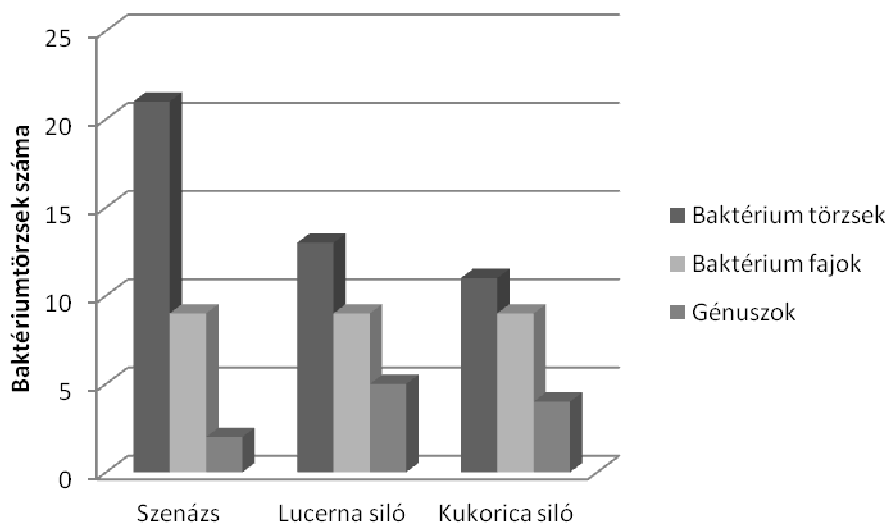


2. ábra: Különböző silókból származó szelektált baktériumtörzsek eloszlása

A *Bacillus licheniformis* és a *Bacillus aryabhattai* fajokból összesen hat-hat törzset izoláltunk a rendelkezésünkre álló silókból. A *Bacillus aerophilus* faj négy izolátumát azonosítottuk molekuláris módszerekkel. A *Bacillus* fajok mellett más fajok is előfordultak: a *Micrococcus luteus*, a *Paenibacillus amylolyticus*, és a *Weissella paramesenteroides* fajtól két-három izolátum került azonosításra (2. ábra).

A strukturális szénhidrátbontó törzsek eloszlása siló típusonként

A legnagyobb diverzitás a lucerna silóból származó baktériumok esetében figyelhető meg, ahonnan 13 baktériumtörzset izoláltunk amelyek kilenc fajhoz tartoztak és öt nemzetségbe sorolhatóak be (*Bacillus* sp., *Paenibacillus* sp., *Arthrobacter* sp., *Micrococcus* sp. és *Weissella* sp.). A szenázs esetében elmondható, hogy az izolált 20 baktériumtörzs, nyolc fajhoz tartozott rendszertanilag és összesen két génuszba volt besorolható (*Bacillus* sp., *Paenibacillus* sp.). A kukorica silóban található strukturális szénhidrátbontó képességgel rendelkező baktériumok összesen 11 baktériumtörzse került elő amely nyolc fajhoz tartozott és három nemzetsége volt besorolható (*Bacillus* sp., *Paenibacillus* sp., *Arthrobacter* sp.) (lásd 3 ábra).

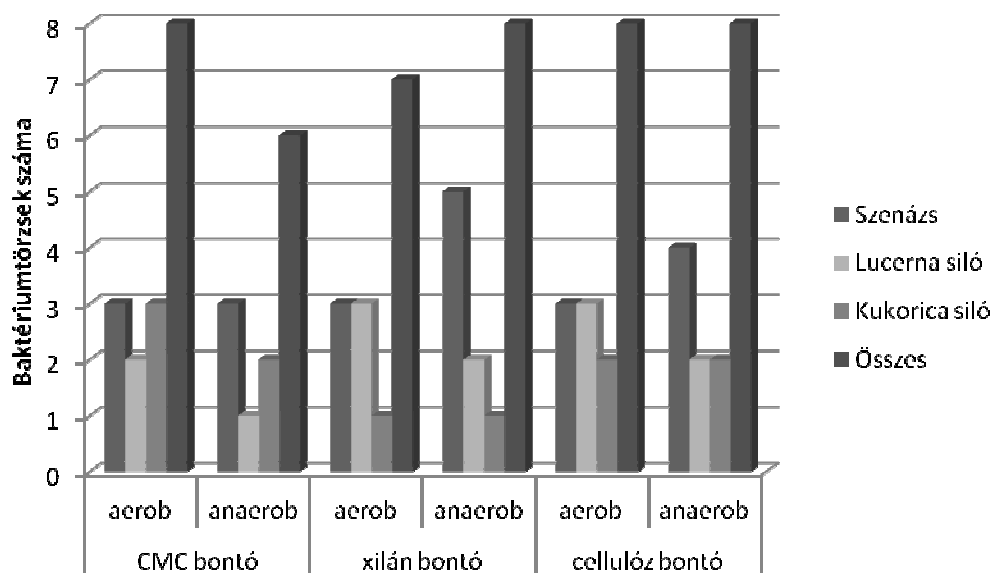


3. ábra: Baktériumtörzsek száma a különböző silók esetében

Az eredmények alapján elmondható, hogy az általunk izolált baktériumokból 14 CMC-t, 15 xilánt és a 16 cellulózt hidrolizáló baktériumtörzset kaptunk, amelyek szenázsból, lucerna és kukorica silókból származtak (lásd 4. ábra).

A CMC tartalmú szelektív táptalajon nyolc aerob és hat anaerob mikroorganizmust izoláltunk. Ebből hat törzs (42,8%) származott szenázsból, három (21,5%) lucerna silóból és öt (35,7%) kukorica silóból. A xilán tartalmú szelektív táptalajon 7 aerob és 8 anaerob baktériumtörzset kaptunk. Ennek 53,33%-át (nyolc törzs) szenázsból, 33,33%-át (öt törzs) lucerna silóból és 13,33%-át (két törzs) kukorica silóból izoláltuk.

A cellulózhasznosító baktériumok közül nyolc aerob és nyolc anaerob törzset kaptunk, amely közül hét törzs (43,75%) szenázsból, öt törzs (31,25%) lucerna silóból és négy izolátum (25%) pedig kukorica silóból származott.



4. ábra: A különböző erjesztett takarmányokból izolált szénhidrátbontó baktériumtörzsek száma

Az izolált és azonosított baktériumtörzsek tekintetében a három típusú erjesztett takarmány közül szenázs bizonyult a legfajgazdagabbnak, ahonnan 21 darab CMC, xilán és cellulózhasonosító baktériumtörzset sikerült azonosítani. A lucerna silóból 13 míg a kukorica silóból 11 strukturális szénhidrát bontó baktériumtörzset izoláltunk és azonosítottunk.

Következtetések

- A három típusú fermentált takarmányból szelektív táptalajon összesen 190 baktérium izolátumot sikerült izolálni. Ebből a 190 izolátumból 55 szelektált izolátum faji szinten lett meghatározva. Ebből megállapítottuk, hogy a fermentált takarmányok autochton strukturális szénhidrát bontó baktériumközössége nagy diverzitást mutat, összesen öt nemzetséghez tartozó 19 fajt sikerült azonosítani.
- Az azonosított strukturális szénhidrát bontására képes, Székelyföldről származó erjesztett takarmányokban előforduló fajok a következő nemzetségekbe tartoztak: *Bacillus* sp., *Paenibacillus* sp., *Arthrobacter* sp., *Micrococcus* sp. és *Weissella* sp. .

- Különböző típusú silótakarmányokból közel azonos arányban sikerült karboximetil-cellulóz (14 törzs, 31,11%), cellulóz (15 törzs, 33,33%) és xilán (16 törzs, 35,55%) hasznosító képességgel rendelkező baktériumtörzseket azonosítani.
- Eredmények alapján elmondható hogy az elemzett silók baktérium diverzitása nagy. Az izolált és azonosított baktériumtörzsek rendelkeznek strukturális szénhidrátbontó képességgel.
- A szelektált baktériumtörzsek közül, annak köszönhetően, hogy helyi silókból lettek izolálva (helyi klimatikus körülményekhez alkalmazkodtak és spontánul kialakult mikrobiális közösségből lettek izolálva) potenciálisan is alkalmazhatóak lennének mint oltóanyag a helyi silók beoltására.

Köszönetnyilvánítás:

A szerző köszönettel tartozik a SILOPREP (POSCCE-A2-O2.1.1-2010-2 (Nr.565/09.09.2013, 45816,) kutatási projektnek a kutatás támogatásáért.

Irodalomjegyzék

- Contreras-Govea F. E. et al. (2013): Lactobacillus plantarum effects on silage fermentation and in vitro microbial yield. Animal Feed Science and Technology. Department of Dairy Science. University of Wisconsin-Madison. 1675 Observatory Drive. Madison. WI 53706. United States. 61– 68. p., doi: 10.1016/j.anifeedsci.2012.11.008
- Dolci P. et al. (2011). Microbial Dynamics during Aerobic Exposure of Corn Silage Stored under Oxygen Barrier or Polyethylene Films. Applied and Environmental Microbiology, Nov. 2011, p. 7499–7507 Vol. 77, No. 21
- Jäntschi L. et al. (2007): National trends on agricultural crops production: cluster analysis. Bulletin USAMV Vol. 63-64: 194-202. p.
- Li Y. – Nishino N. (2011). Monitoring the bacterial community of maize silage stored in a bunker silo inoculated with Enterococcus faecium, Lactobacillus plantarum and Lactobacillus buchneri. Journal of Applied Microbiology 110, 1561–1570
- Mohd-Setapar S. H. et al. (2012): Review on Crucial Parameters of Silage Quality. APCBEE Procedia 3. Center of Life Science & Applied Research (CLEAR). Universiti Teknologi Malaysia. 99 – 103. p., doi: 10.1016/j.apcbee.2012.06.053

Oude E. – Driehuis F. – Gottschal J. – Spoelstra S. (1999): Silage fermentation processes and their manipulati. In: FAO Electronic Conference on Tropical Silage. Institute for Animal Science and Health. 1-28. p.

<http://www.agraroldal.hu/kukorica-9.html> (2014. 09.24)

<http://www.insse.ro/cms/ro/content/anuarul-statistic-2013> (2015.11.19)

Abstract

Silage is a preservation method of moist crops whereby lactic acid bacteria convert water-soluble carbohydrates into organic acids under anaerobic conditions. The aim of our research was the isolation and characterization of structural carbohydrate degrading microorganisms from corn, alfalfa and grass silage. As result of our research we isolated 190 bacterial isolate, selected 55 bacterial strains and identified 19 species using 16S rDNA sequence analysis. The bacterial genera isolated from the 3 different type of silages were the following: *Bacillus sp.*, *Paenibacillus sp.*, *Arthrobacter sp.*, *Micrococcus sp.* and *Weissella sp.* The isolated, selected and characterized bacterial strains have potential for the development of silage inoculants.

Rezumat

Însilozarea este o metodă de conservare a plantelor furajere unde bacteriile lactice realizează în condiții anaerobe conversia carbohidraților solubile în apă în acizi organici. Obiectivul cercetării a fost izolarea și caracterizarea bacteriilor care degradează carbohidrații structurali din diferite tipuri de siloz. În urma cercetării am izolat 190 de izolate bacteriene, din care am selectat 55 tulpini bacteriene aparținând de 19 specii. Genurile bacteriene izolate din cele trei tipuri de siloz au fost următoarele: *Bacillus sp.*, *Paenibacillus sp.*, *Arthrobacter sp.*, *Micrococcus sp.* și *Weissella sp.* Tulpinile bacteriene izolate, selectate și caracterizate au potențial în formularea unor inoculanți bacterieni de siloz.