

Mikroflora kiszonek

Elżbieta Kukier, Krzysztof Kwiatek, Tomasz Grenda, Magdalena Goldsztejn

z Zakładu Higieny Pasz Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

O produktywności zwierząt gospodarskich decydują osiągnięcia w hodowli, statusie zdrowotnym stada i żywieniu zwierząt. Warunkiem zdrowia i dobrych wyników hodowlanych jest stosowanie paszy o wysokiej wartości odżywczej. Kluczem do sukcesu w hodowli bydła jest maksymalizacja udziału dobrej jakościowo kiszonki (50–75%) w dziennej dawce pokarmowej (1). Kiszonkę dobrej jakości cechuje pH 4–5, wysoka wartość pokarmowa, smakowitość (przyjemny zapach, dobrze zachowana struktura, oliwkowy kolor), stabilność tlenowa (niepodatność na wtórną fermentację) i prawidłowa jakość mikrobiologiczna. Szacuje się, że każde podwyższenie temperatury kiszonki o 10°C powoduje podwojenie aktywności biologicznej zasiedlających ją mikroorganizmów. Karmienie zwierząt niestabilną tlenowo kiszonką z kukurydzy powoduje hamowanie fermentacji w żwaczku, wzrost pH płynu żwaczowego, obniżenie ogólnej zawartości lotnych kwasów tłuszczowych (kwasy octowy i propionowy) oraz wzrost ilości kwasu masłowego i amoniaku (2, 3). Obniża to wykorzystanie białka paszy i syntezę białka mikrobiologicznego w żwaczku. Kiszonki niestabilne tlenowo obniżają również ilość pierwotniaków w żwaczku, zmieniają kolor i zapach płynu żwaczowego, a wtórna fermentacja kiszonki pogarsza ich smakowitość, obniżając pobieranie paszy oraz prowadzi do zmian w składzie i jakości mleka. Karmienie taką kiszonką obniża odporność zwierząt, co sprzyja występowaniu chorób (*mastitis*, biegunki, choroby racic) i ma bezpośredni wpływ na stan zdrowia i odporność rodzących się cieląt, które są mniej żywotne i bardziej podatne na zachorowania (biegunki, wyższa śmiertelność). Trudności sprawia także leczenie zapaleń wymienia o podłożu grzybiczym, które są długotrwałe i nawracające. Ponadto obecność toksycznych metabolitów pleśni w kiszonkach (T-2, zearalenon) zaburza gospodarkę hormonalną zwierząt, co objawia się opóźnieniem rui, ronieniami, zapaleniami macicy w okresie poporodowym i krwawieniami z gruczołu mlekowego u samic, a u samców pogarsza się jakość nasienia.

Poza niekorzystnym wpływem na zdrowie zwierząt, kiszonka zawierająca liczne drobnoustroje niepożądane (*Clostridium tyrobutyricum*, *Bacillus sporothermodurans*, *Geobacillus steaerotherophilus*) czy patogeny (*L. monocytogenes*, *C. botulinum*, *E. coli*, *B. cereus*) jest źródłem kontaminacji

surowców i produktów żywnościowych pozyskiwanych od zwierząt (mleko, mięso; 4). Pogarsza to ich jakość mikrobiologiczną i przydatność technologiczną oraz stanowi zagrożenie dla zdrowia ludzi. Potwierdzają to m.in. badania holenderskie, w których wykazano, że poziom zanieczyszczenia mleka przez spory bakterii kwasu masłowego zależy przede wszystkim od ich liczby w skarmianej kiszonce, a tylko w niewielkim stopniu od czyszczenia strzyków przed udojem czy higieny w oborze (5).

Specyfika kiszzonej paszy, tj. wysoka aktywność wody (>0,8) i technologia produkcji (brak obróbki termicznej surowca, konserwacja paszy przy udziale bakterii kwasu mlekowego) sprawiają, że jakość higieniczna kiszonki jest bezwzględnie zależna od mikroflory obecnej w zielonce, uzyskanych warunków fermentacji i użytego biopreparatu do zakiszania. Mikroflora zakiszanych zielonek jest odzwierciedleniem mikroflory gleby, z której zostały pozyskane. Ta z kolei zależy od rejonu geograficznego, jakości gleby, nawożenia, zwierząt występujących na danym terenie (owady, gryzonie, ptaki) czy warunków klimatycznych. Na roślinach przeznaczonych do zakiszania występują bakterie tlenowe, bakterie beztlenowe i grzyby mające bezpośredni wpływ na jakość otrzymanej kiszonki (tab. 1). Dominującą populacją są drobnoustroje tlenowe i fakultatywnie tlenowe, a liczba bakterii kwasu mlekowego odpowiedzialna za konserwację kiszonki jest kilka rzędów wielkości niższa od innych grup mikroorganizmów (6). Mianem bakterii kwasu mlekowego określa się takie rodzaje, jak: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* i *Leuconostoc*. Głównym produktem powstającym w wyniku fermentacji cukrów przez te bakterie jest kwas mlekowy, a produktami ubocznymi są: kwas octowy, etanol i dwutlenek węgla. Nie do końca wyjaśniono zjawisko dominacji bakterii kwasu mlekowego w silosie, jednak wiadomo o produkowanym przez wiele gatunków bakteriobójczym nadtlenu wodoru (7), bakteriocynach i innych substancjach (8) wykazujących właściwości bakteriostatyczne wobec *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Bacillus* spp., *Listeria* spp. czy *Escherichia coli* (9, 10). Dowiedziono, że dodatkowa suplementacja kiszonki bakteriami kwasu mlekowego (biopreparaty do zakiszania) zapewnia niższe pH i wyższą stabilność tlenową kiszonki w porównaniu do metody spontanicznej fermentacji (11, 12).

Microflora of silages

Kukier E., Kwiatek K., Grenda T., Goldsztejn M.,
Department of Hygiene of Animal Feedingstuffs,
National Veterinary Research Institute, Pulawy

Microbiological quality of silage has an enormous impact on health and productivity of farm animals, as well as human safety. Therefore, it is important proper fertilising of fields and crops of which silage is made, correctness of ensiling management and thermal processing of food of animal origin (milk, meat) in which pathogenic factors for human may occur (*L. monocytogenes*, *C. botulinum*, botulinum toxins). In this study, groups of microorganisms commonly present in silage, potential pathogens of animals and caused by them diseases, also recent results of microbiological study on silage used in animal feeding in Poland, are presented.

Keywords: silage, microorganism, ensiling, *C. botulinum*, *L. monocytogenes*.

Wiele wskazuje na to, że drożdże są tą grupą drobnoustrojów tlenowych, która ma największy wpływ na jakość kiszonki. Do wzrostu potrzebują cukrów i kwasu mlekowego, które są podstawowymi składnikami kiszonek. Zdolność wzrostu nawet przy pH 3,5 sprawia, że w większości przypadków drożdże są pierwszą grupą drobnoustrojów namnażających się, gdy do kiszonki dostaje się tlen (rozszczelnienie silosu, wybieranie kiszonki). Znacznie wolniej w takich warunkach rosną bakterie kwasu octowego i pleśnie. Namnażanie drożdży w warunkach tlenowych z wykorzystaniem kwasu mlekowego, podnosi pH kiszonki i ułatwia namnażanie innych drobnoustrojów tlenowych (psucie), szczególnie gdy pH wzrasta powyżej 4,5.

Pleśnie to grzyby strzępkowe, rosnące powoli w warunkach tlenowych i powszechnie obecne w środowisku (gleba, owady) i na roślinach uprawnych. Chociaż mogą rosnąć na dość szerokiej gamie związków, to w kiszonce pojawiają się w znaczącej ilości dopiero, gdy ta ulegnie znaczącemu zepsuciu przez drożdże i inne bakterie tlenowe, a wizualne stwierdzenie ich obecności jest indykatorem kiszonki złej jakości, z wysokim prawdopodobieństwem skażenia mikotoksynami. Biorąc pod uwagę czas produkcji mikotoksyn w kiszonce, dzieli się je na polowe (powstające w trakcie wegetacji roślin) i mikotoksyny kisenia (powstające w trakcie kisenia; tab. 2). Mikotoksyny najczęściej produkowane przez gatunki *Fusarium* w kiszonkach to trichoteceny (deoksynivalenol – DON), niwalenol (NIV), diacetoksyscirpenol (DAS), T2, HT2, zearalenon (ZEA) i fumonizyny. Pleśnie te, choć występują ubikwitalnie, są szczególnie rozpowszechnione w klimacie umiarkowanym. Produkcja

Tabela 1. Liczba drobnoustrojów występujących na roślinach przed zakiszeniem i w kiszonkach (52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59)

Grupa drobnoustrojów	Liczba drobnoustrojów na roślinach (jtk/g)	Liczba drobnoustrojów w kiszonce (jtk/g)	Liczba drobnoustrojów w kiszonce (jtk/g) wyniki PIWet-PIB Puławy
Bakterie tlenowe	>10 000 000 1 000 000 (K) 200 000 (L)	150 000 (K) 72 000 (L) 160 000 (L) 1 750 000 (L)	3400–32 000 000 (K) (średnia 2 077 267) 1600–3 600 000 000 (T) (średnia 275 271 528)
Drobnoustroje	-	-	6200–440 000 000 (K) (średnia 31 121 941) 2100–5 300 000 000 (T) (średnia 407 378 042)
Bakterie kwasu mlekowego	10–1 000 000	57 000 (L) 1 200 000 (L) 65 000 000–153 000 000 (K)	-
<i>Lactobacillus</i> spp.	6400 (K) <10 (L) od <100 do >2000 (K)	36 000 (L) 16 000 000 (L)	100–450 000 000 (K) (średnia 38 664 412) 2300–750 000 000 (T) (średnia 97 273 521)
<i>Enterococcus</i> spp.	100 000 (K) 1600 (L)	3 000 (L)	-
Enterobacteriaceae	1000–1 000 000 1 000–1 000 000 (L) 100 000–10 000 000 (K)	200–5400 (K)	<10–20 000 (K) (średnia 671) <10–890 (T) (średnia 67)
<i>E. coli</i>	-	-	<10–750 (K) (średnia 24) <10–250 (T) (średnia 17)
Drożdże i grzyby drożdżopodobne	1000–100 000	1300 (K) 120 000 (L) 660 000–2 600 000 (K)	-
Drożdże i pleśnie	3200 (K) 640 (L)	6 300 (T) 1 000 000 (K)	10–780 000 000 (K) (średnia 41 014 356) 10–42 000 000 (T) (średnia 7 708 964)
Pleśnie	1000–10 000	35 (K) 1 000 000 (L) 2 000–13 400 (K)	-
<i>Clostridium</i> (przetrawniki)	100–1 000 <10 (K) 2000 (L)	30 (K) 25 000 000 (L) 30–230 (K)	<10–10 000 (K) (średnia 3 209) <10–1 000 (T) (średnia 687)
<i>C. perfringens</i>	-	-	<10 (K) <10 (T)
<i>Bacillus</i> (przetrawniki)	100–1 000	570 (K) 2 000 (K) 32 000 (K) 63 000 (T)	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	1000 (K) 160 (K) 250 (K+T)	<10 (K) <10 (T)
Bakterie kwasu octowego	100–1 000	-	-
Bakterie kwasu propionowego	10–1 000	-	-
Spory bakterii kwasu masłowego	10–100	1 000 000 1 000 (T, K)	-

K – kiszonka z kukurydzy, T – kiszonka z traw, L – kiszonka z lucerny

mikotoksyn fuzaryjnych odbywa się jedynie w trakcie wegetacji roślin, ponieważ pleśnie z rodzaju *Fusarium* nie mogą namnażać się w kwaśnym i beztlenowym środowisku kiszonki (13). Mikotoksynami najczęściej występującymi w kiszonkach są DON i ZEA, a kiszonka z kukurydzy jest ich najważniejszym źródłem dla zwierząt (14). Wysokie skażenie kiszonek przez mikotoksyny fuzaryjne obserwuje się w zewnętrznych partiach kiszonki, gdzie ma miejsce zaawansowany proces psucia tlenowego (15). Najważniejszą aflatoksyną, biorąc pod uwagę toksyczność i wysoki wskaźnik przeniesienia z paszy do mleka, jest aflatoksyna B1. Pleśnie z rodzaju *Aspergillus* i ich mikotoksyny zanieczyszczają rośliny w trakcie wegetacji, zwłaszcza w klimacie podzwrotnikowym i ciepłym. Ryzyko zakażenia kukurydzy przez pleśnie

Aspergillus i produkcji aflatoksyn roślinie wraz ze stopniem uszkodzenia roślin przez owady oraz występowaniem stresu środowiskowego (susza). Ponieważ większość gatunków pleśni jest obligatoryjnymi tlenowcami, nie mogą one rozwijać się w dobrze zakonserwowanej, beztlenowej kiszonce. W praktyce, jednak szczelność beztlenowego środowiska kiszonki jest naruszana przez uszkodzenia mechaniczne opakowań (gryzonie, ptaki, koty), porowatość stosowanych opakowań oraz otwieranie kiszonki podczas jej wybierania. Dlatego też pleśnie występują częściej w wierzchnich warstwach kiszonki, a prawidłowo prowadzony proces kiszenia, w tym dobre ubicie kiszonki, gwarantuje relatywnie niski poziom mikotoksyn w kiszonce, porównywalny do poziomu w zakiszanych zielonkach.

Bakterie kwasu octowego są mikroorganizmami tlenowymi rosnącymi przy niskim pH, rozkładającymi etanol do kwasu octowego, a po jego wyczerpaniu kwas octowy do dwutlenku węgla i wody. Podnosi to pH kiszonki i umożliwia wzrost innym drobnoustrojom tlenowym, pogarszając jakość kiszonki.

Do bakterii rosnących w warunkach tlenowych i beztlenowych należą rodziny Bacillaceae, Paenibacillaceae i Enterobacteriaceae. Dwie pierwsze rodziny rozkładają cukry i kwasy organiczne w kiszonce i kontynuują rozpoczęty już proces psucia kiszonki podanej ekspozycji na tlen. W pierwszym stadium psucia kiszonki drożdże i bakterie kwasu octowego podwyższają pH ($\geq 4,5$) i temperaturę kiszonki ($\sim 40^\circ\text{C}$), a w drugim etapie temperatura wzrasta do około 50°C , pojawia

Tabela 2. Najważniejsze mikotoksyny i pleśnie toksynotwórcze występujące w zielonkach i kiszonkach (1)

Grupa mikotoksynu	Toksyna	Gatunek pleśni / źródło pleśni ¹	Roślina
Aflatoksyny	aflatoksyna B1, B2, G1, G2	<i>Aspergillus flavus</i> /P <i>Aspergillus parasiticus</i> /P	kukurydza
Trichoteceny	Typ A: T2, DAS Typ B: DON, NIV	<i>Fusarium langsetiae</i> /P <i>Fusarium poae</i> /P <i>Fusarium sporotrichioides</i> /P <i>Fusarium graminearum</i> /P <i>Fusarium culmorum</i> /P	kukurydza, zboża drobnziarniste ² kukurydza, zboża drobnziarniste
Fumonizyny	fumonizyna B1, B2	<i>Fusarium verticillioides</i> /P <i>Fusarium proliferatum</i> /P	kukurydza
Laktony kwasu rezorcylowego	ZEA	<i>Fusarium graminearum</i> /P <i>Fusarium culmorum</i> /P	kukurydza, zboża drobnziarniste, trawa
Ochratoksyny	ochratoksyna A	<i>Aspergillus ochraceus</i> /P <i>Penicillium verrucosum</i> /P	zboża drobnziarniste
Alkaloidy sporyszu	klawiny, amid kwasu lisergowego, ergotamina lolitrem B, ergowalina	<i>Claviceps purpurea</i> /P <i>Neotyphodium lolii</i> /P <i>Neotyphodium coenophialum</i> /P	zboża drobnziarniste trawa
Toksyny <i>P. roqueforti</i>	roquefortyna C, kwas mykofenolowy	<i>Penicillium roqueforti</i> /K <i>Penicillium paneum</i> /K	wszystkie ww.
Toksyny <i>A. fumigatus</i>	gliotoksyna, fumigaklawiny	<i>Aspergillus fumigatus</i> /K	wszystkie ww.
Toksyny <i>M. ruber</i>	monakolina K, cytrynina	<i>Monascus ruber</i> /K	wszystkie ww.

¹ źródło pleśni: P – polowe, K – kisznie; ² pszenica, pszenżyto, żyto, jęczmień

się śliskość kiszonki i jest to najczęściej efekt aktywności bacilli (16). Należy dodać, że w obrębie tej grupy występują gatunki, będące przyczyną psucia się produktów UHT (*B. sporothermodurans*). Ponieważ rezerwuarem bakterii z rodzaju *Bacillus* jest gleba, liczba tych drobnoustrojów w zielonce określa jej zanieczyszczenie glebowe. W kiszonce z kolei, liczba tlenowych laseczek przetrwalnikujących jest wyższa w partiach, do których dociera tlen i postępuje proces psucia tlenowego kiszonki. Wykazano ponadto, że niektóre gatunki z rodzaju *Bacillus* namnażają się w kiszonkach wolniej niż inne, czego przykładem jest *B. cereus*, którego głównym źródłem w mleku surowym jest ściółka (trociny), pomimo że drobnoustrój ten występuje też w kiszonkach (17).

Pałeczki jelitowe (Enterobacteriaceae) jako fakultatywne beztlenowce uaktywniają się w kiszonce w warunkach beztlenowych. W początkowej fazie procesu kisznienia pałeczki jelitowe konkurują m.in. z bakteriami kwasu mlekowego o substancje odżywcze. Większość gatunków jednak ginie lub ich namnażanie zostaje zahamowane, gdy pH spada poniżej 4,5–5,0. Bakterie te przeżywiają jedynie w miejscach, gdzie dociera tlen, a wraz z tlenowym psuciem kiszonki i wzrostem pH mogą się namnażać, osiągając nawet 10⁸ jtk/g (18). Pałeczki jelitowe są głównym źródłem gazu w silosie (różne tlenki azotu) oraz najważniejszym rywalem bakterii kwasu mlekowego fermentujących cukry do kwasu octowego. Innymi produktami ich aktywności są kwas bursztynowy i 2,3-butanodiol, dlatego fermentacja ta nie jest pożądana w kiszonce. Ponadto obecność

pałeczek jelitowych stwarza ryzyko obecności endotoksyn w kiszonce, choć jak dotąd niewiele wiadomo na ten temat. Podejrzewa się też, że produkty metabolizmu Enterobacteriaceae są bezpośrednią przyczyną niskiej smakowitości i słabego pobierania kiszonki przez zwierzęta, która zawiera dużo kwasu octowego. Wykazano też, że spożywanie kiszonki roślinie, gdy kwas octowy w kiszonce jest wyprodukowany przez *Lactobacillus buchneri* (19).

Ponieważ rezerwuarem *Clostridium* spp. w środowisku jest kultywacyjna warstwa gleby i treść przewodu pokarmowego organizmów żywych, to liczba tych drobnoustrojów w zielonce jest wskaźnikiem zanieczyszczenia glebowego i kałowego. Beztlenowe laseczki przetrwalnikujące z rodzaju *Clostridium* są bezwzględnie beztlenowcami, a ich aktywność metaboliczna wpływa na jakość kiszonki dopiero, gdy bakterie kwasu mlekowego zakończą fazę aktywnego wzrostu. Biorąc pod uwagę fermentowane substraty wyróżnia się trzy grupy *Clostridium* w kiszonce: proteolityczne, fermentujące głównie aminokwasy; grupę *Clostridium butyricum*, fermentującą węglowodany i gatunek *Clostridium tyrobutyricum*, który metabolizuje głównie kwas mlekowy. Produktami rozkładu aminokwasów są: amoniak, aminy i dwutlenek węgla, a głównymi metabolitami grupy *C. butyricum* i gatunku *C. tyrobutyricum* są: kwasy masłowy, octowy, wodór i dwutlenek węgla. Nie do końca poznano mechanizm negatywnego wpływu metabolitów *Clostridium* na jakość kiszonki, jednak pewne jest, że zwierzęta niechętnie pobierają kiszonkę, gdy poziom kwasu

masłowego przekracza 5g/kg suchej masy. U krów w okresie laktacji wzrasta też ryzyko ketozy. Ponadto rozkład kwasu mlekowego do kwasu masłowego jest jedną z najbardziej energochłonnych reakcji, w której następuje utrata około 50% suchej masy kiszonki (20).

Ponieważ wszystkie wymienione powyżej grupy drobnoustrojów mogą wykazywać aktywność metaboliczną w sprzyjającym środowisku kiszonki (zawartość suchej masy zwykle od 200 do 500 g/kg), dlatego niezwykle ważna jest poprawność całego procesu produkcji kiszonki (zbiór zielonek we właściwym stadium wegetacji, odpowiednie uciecie kiszonki, szczelność silosu fermentacyjnego, prawidłowe wybieranie kiszonki ograniczające do minimum dostęp tlenu), ograniczająca aktywność biologiczną niepożądanych grup drobnoustrojów. Liczebność poszczególnych grup drobnoustrojów w kiszonce informuje przede wszystkim o jej ogólnym stanie higienicznym i wartości odżywczej. Ocena jakości mikrobiologicznej kiszonki uwzględniać powinna także obecność patogenów i produkowanych przez nie toksyn. Według Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności najważniejszymi patogenami jakie mogą występować i namnażać się w kiszonkach są *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes* oraz *Escherichia coli* O157:H7 (21). Kiszonki są również wskazywane jako źródło toksynotwórczych pleśni, będących przyczyną mikotoksykozy zwierząt (22).

Źródłem *C. botulinum* jest gleba, osady wodne (rzeki, jeziora, morza, oceany) ale również owady wodne, mięczaki, skorupiaki i kręgowce (m.in. zdrowe ptaki).

Przetrawianie w niekorzystnych warunkach środowiskowych umożliwia temu gatunkowi wytwarzanie termoopornych przetrwalników. Czas redukcji dziesiętnej spor *C. botulinum* wynosi 255, 98 i 4,2 minuty odpowiednio w 75, 85 i 93°C (23). Biorąc pod uwagę rezerwuuar patogenu i sposób produkcji pasz, najwyższym ryzykiem wystąpienia *C. botulinum* i toksyn botulinowych wśród pasz są kiszonki (bezpośredni kontakt zielonki z glebą, brak obróbki termicznej paszy; 24, 25). Kluczowe znaczenie w aspekcie botulizmu zwierząt ma pH kiszonki, ponieważ toksyny botulinowe są produkowane przy pH powyżej 4,6. Potencjalnym źródłem toksyn botulinowych są kiszonki o zbyt wysokiej zawartości suchej masy (zakazanie przesuszonego materiału roślinnego lub zebranego w zbyt późnym stadium wegetacji). Kielkowaniu spor *C. botulinum* i produkcji toksyn botulinowych w kiszonkach sprzyjają dodatkowo letnie upały (26), zastępujące pasteryzację stosowaną w hodowli *Clostridium* spp. w laboratorium (70–80°C/10 minut). Namnażanie laseczek *C. botulinum* obecnych w kiszonce może hamować wysoka zawartość suchej masy czy niskie pH kiszonki, jednak już sama obecność tego gatunku prowadzi do rozległej fermentacji wtórnej kiszonki (27). *C. botulinum* dostaje się do kiszonki wraz z glebą zanieczyszczającą zielonkę (gleba bogata w materię organiczną, z terenów zalewowych, podmokłych), szczątkami padłych zwierząt (ptaki, ssaki, jaszczurki) czy pomiotem kurzym. Podejrzewa się również, że nawożenie upraw przeznaczonych na kiszonki pozostałościami fermentacyjnymi z biogazowni może być pierwotną przyczyną obecności *C. botulinum* w zielonce, a w konsekwencji botulizmu bydła. Przemawiają za tym liczne przypadki przewlekłej postaci botulizmu bydła w północnej części Niemiec, gdzie jest najwyższa koncentracja instalacji biogazowych w tym kraju (informacja ustna). Ponadto wzrost liczby przypadków botulizmu bydła w Niemczech obserwowany jest od połowy lat 90. XX wieku (28), co zbiega się w czasie z budową pierwszych biogazowni w tym kraju (początek lat 90.). Badania prowadzone przez autorów artykułu wykazały też, że w osadach pofermentacyjnych z biogazowni znajdują się liczne przetrwalniki *Clostridium* spp. (10^4 – 10^6 spor/g; niepublikowane dane własne), co identyfikuje dygestat jako źródło beztlenowców dla nawożonych nim roślin. Wzrost liczby przypadków botulizmu bydła jest obserwowany także we Francji (od 1990 r.), Wielkiej Brytanii (od 2003 r.) i Australii (29). Niepokojące z punktu widzenia ochrony zdrowia publicznego są doniesienia niemieckich badaczy, którzy obecność *C. botulinum* i toksyn botulinowych stwierdzili w mleku i tkance wymienia pochodzących od krów podejrzanych o botulizm.

W Polsce obserwuje się rocznie od kilku do kilkunastu ognisk botulizmu zwierząt. Zachorowania występują u bydła karmionego kiszonkami, rzadziej u koni karmionych kiszonką z traw (30, 31, 32, 33). Obserwowane przypadki botulizmu bydła w Polsce obejmują zwykle od kilku do kilkunastu sztuk zwierząt w stadzie, co sugeruje ogniskowe występowanie patogenu i jego toksyn w kiszonkach, a w przypadku kiszonek z traw objawy choroby manifestują zwykle zwierzęta karmione paszą z tej samej beli. Choroba przebiega z objawami wiotkiego porażenia mięśni szkieletowych, spowodowanego blokowaniem przewodnictwa nerwowo-mięśniowego. Porażenia zaczynają się najczęściej od mięśni głowy i mają charakter zstępujący. Objawy pojawiają się od 18 do 48 h po spożyciu karmy zanieczyszczonej BoNT (rzadziej od 6 h do 10 dni). U bydła pojawia się osłabienie języka, ślinotok, trudności w połykaniu, opadanie uszu, chwiejny i powolny chód, zaleganie, brak apetytu, zmniejszone napięcie skóry, obniżona temperatura, wysokie tętno i niskie pH krwi. U koni obserwuje się letarg, brak apetytu, trudności w żuciu i połykaniu pokarmu, wypadanie języka (brak reakcji na pociągnięcie języka), utratę masy ciała, osłabienie (drżenie) mięśni piersiowych i przednich kończyn oraz podwyższone tętno. Zwierzęta mogą przyjmować charakterystyczną pozycję żaby (kończyny tylne szeroko rozstawione, przednie kończyny wysunięte do przodu), co ułatwia im oddychanie. Powikłaniem botulizmu może być zachyłkowe zapalenie płuc. Nieleczony botulizm może prowadzić do śmierci w wyniku porażenia mięśni oddechowych. Botulizm jest zoonozą, co potwierdziły również opisane niedawno w Niemczech pierwsze przypadki botulizmu ludzi mających bliski kontakt ze zwierzętami chorymi na botulizm (34, 35).

W obrębie rodzaju *Listeria* opisano dotąd dwa gatunki patogenne dla człowieka i zwierząt, *L. monocytogenes* i *L. ivanovii* (36, 37). Jednak dominującym czynnikiem etiologicznym rejestrowanych przypadków listeriozy jest pierwszy z wymienionych patogenów (38, 39). *Listeria monocytogenes* występuje powszechnie w przyrodzie i charakteryzuje się rzadko spotykaną w świecie bakterii opornością na czynniki fizykochemiczne. Drobnoustrój ten może przeżyć do 2 lat w glebie, kilka lat w chłodni, a nawet 5 minut w 80°C. Ponadto rośnie on w bardzo szerokim zakresie temperatur (0–45°C), przy pH od 4,2 do 9,6, toleruje wysokie stężenia soli (do 10%), niską aktywność wody (~0,83) i jest względnym beztlenowcem. Był on wielokrotnie izolowany z gleby, wody (jeziora, rzeki, wody przybrzeżne), gnijących roślin, ściętek i przewodów pokarmowych zdrowych zwierząt (6–30% bydła, owiec, kóz, świń, drobiu; 40, 41, 42). Ocenia się że

L. monocytogenes może występować w około 10% kiszonek, zwłaszcza złej jakości, tj. niewystarczająco sprasowanych (liczne kieszenie tlenowe), słabo sfermentowanych, o pH wyższym niż 4,2 czy eksponowanych na tlen. Również szczepy należące do rodzaju *Listeria* izolowano częściej z kiszonek o pH \geq 4,5 (30%) niż z kiszonek o pH $<$ 4,5 (6%) (43). *L. monocytogenes* izolowana jest częściej z kiszonek belowanych w porównaniu do kiszonek przymowanych, co wynika z trudności w ubiciu, słabszej fermentacji i wyższej podatności opakowań bel na uszkodzenia mechaniczne. Większość szczepów *L. monocytogenes* wyizolowano z wierzchnich warstw kiszonek, kiszonek o wyższym pH i bardziej podatnych na degradację tlenową. Opiswane dotąd przypadki listeriozy zwierząt hodowlanych wskazują na kiszonki, jako pierwotne lub wysoko prawdopodobne źródło tego patogenu (44, 45, 46, 47). Listerioza jest chorobą zakaźną, przebiegająca najczęściej w formie sporadycznych zachorowań w stadzie. Do najważniejszych objawów listeriozy zwierząt należą: wzrost temperatury ciała oraz objawy nerwowe, takie jak: ślinienie, światłowstręt, wyciek z oczu, nozdry, skurcze mięśni, zgrzytanie zębami, ruchy manewrowe (kręcenie się w koło w jednym kierunku), parcie na przeszko. Obserwowane są również okresy podniecenia z utratą świadomości, a w końcowym okresie choroby występują porażenia i niedowłady. W niektórych przypadkach jedynym objawem choroby mogą być ronienia. U cieląt noworodków w formie septycznej listeriozy występuje biegunka. *L. monocytogenes* jest czynnikiem zoonotycznym, a patogen obecny w żywności pochodzenia zwierzęcego (mleko, sery) może wywoływać listeriozę ludzi (48).

Najważniejszymi patogenami z rodziny Enterobacteriaceae, które potencjalnie mogą wystąpić w kiszonkach, są shigatoksynne (STEC) szczepy *E. coli*. Jest to tym bardziej prawdopodobne, że głównym i naturalnym rezerwuarem STEC jest przewód pokarmowy zdrowych przeżuwaczy, a mleko surowe, produkty z niepasteryzowanego mleka czy kontakt ze zwierzętami były jedynokrotnie źródłem zakażeń ludzi przez *E. coli* O157:H7 (49). Jak dotąd nie opisano jednak przypadków izolowania STEC z kiszonek, chociaż badania wykazały, że *E. coli* O157:H7 może przeżyć w kiszonce o nieprawidłowo przebiegającym procesie kiszenia, łatwo ulegającej tlenowemu psuciu (50, 51).

Jakość mikrobiologiczną kiszonek stosowanych w żywieniu bydła w Polsce oceniano w latach 2012–2014 w Zakładzie Higieny Pasz PIWet-PIB w Puławach. Badania obejmowały 122 próbki kiszonek (kiszonki z kukurydzy, traw, lucerny, konicyzny, wysłoków buraczanych, sorgo) z 13 województw (kujawsko-pomorskie, lubelskie, lubuskie, łódzkie, małopolskie, mazowieckie,

podlaskie, pomorskie, śląskie, świętokrzyskie, warmińsko-mazurskie, wielkopolskie, zachodniopomorskie). Próbki kiszonek były pobierane od stycznia do czerwca. Fermy hodowlane liczyły od 7 do 2700 sztuk bydła. W uprawie roślin przeznaczonych na kiszonki stosowano nawozy naturalne (gnojowica, obornik), nawozy mineralne (azot, fosfor, potas, siarka, magnez, wapń, sól) oraz moczownik. W przypadku dwunastu kiszonek zastosowano preparaty do zakiszania. Z uzyskanego wywiadu wynikało, że w czasie skarmiania kiszonek nie obserwowano zachorowań zwierząt, które mogłyby być spowodowane niewłaściwą jakością mikrobiologiczną kiszonek (listerioza, botulizm). Do badań stosowano znormalizowane metody badawcze i metody własne oparte o techniki PCR (konwencjonalny PCR, real-time PCR, sekwencjonowanie genu 16S rRNA). Badania obejmowały wykrywanie: *Salmonella* spp., *C. botulinum*, *L. monocytogenes*, *Campylobacter* spp., oznaczanie liczby Enterobacteriaceae, *Escherichia coli*, *C. perfringens*, *Clostridium* spp., *Bacillus* spp., koagulododatnich *Staphylococcus* spp., bakterii tlenowych mezofilnych, grzybów, drobnoustrojów i *Lactobacillus* spp. oraz określanie toksycności izolatów z gatunku *C. perfringens* i *C. botulinum*. Przeprowadzone badania wykazały, że 75,4% badanych kiszonek miało niewłaściwą wartość pH (od 3,07 do 7,13), co wskazuje na nieprawidłowości w prowadzonym procesie zakiszania. W 29,5% wszystkich kiszonek zanotowano pH wyższe niż 5 i były to zarówno kiszonki z traw (66%), jak i kiszonki z kukurydzy (33%). Jest to wskaźnik zbyt wysokiej zawartości suchej masy w kiszonce, będący efektem zakiszenia przesuszonego materiału roślinnego lub zebranego w zbyt późnym stadium wegetacji. W 45% wszystkich kiszonek stwierdzono pH niższe od 4 i było to obserwowane jedynie w kiszonkach z kukurydzy. Świadczy to o niskiej zawartości suchej masy w kiszonce, będącej następstwem burzliwego przebiegu fermentacji. Zjawisko to jest również niekorzystne, ze względu na straty składników odżywczych kiszonki. Liczba drobnoustrojów w badanych kiszonkach wahała się od $1,3 \times 10^3$ do $5,3 \times 10^9$ jtk/g, liczba bakterii tlenowych mezofilnych od $1,3 \times 10^3$ do $4,9 \times 10^{11}$ jtk/g, liczba grzybów od 10 do $5,0 \times 10^8$ jtk/g, liczba bakterii z rodzaju *Lactobacillus* od 10 do $2,4 \times 10^9$ jtk/g, a liczba bakterii z rodziny Enterobacteriaceae od poniżej 10 do $2,7 \times 10^4$ jtk/g. Obecność *E. coli* stwierdzono w 4 (3,3%) próbkach kiszonek, a liczba tych bakterii wahała się od poniżej 10 do $3,2 \times 10^3$ jtk/g. Obecność *C. perfringens* stwierdzono w 21 badanych kiszonkach (17,2%), a liczba bakterii z tego gatunku wynosiła od poniżej 10 do $4,0 \times 10^2$ jtk/g. Wszystkie wyizolowane szczepy *C. perfringens* należały do toksotypu A, a 13 izolatów (62%) posiadało również gen

kodujący toksynę beta2. Liczba beztlenowych laseczek przetrwalnikujących z rodzaju *Clostridium* wynosiła od poniżej 10 do 10^5 jtk/g. *L. monocytogenes* wyizolowano z jednej kiszonki z traw (0,8%), a *L. ivanovii* z 5 kiszonek z kukurydzy i 4 kiszonek z traw (7,4% próbek dodatnich). Obecność niepatogennych gatunków *Listeria* wykazano w 21 badanych kiszonkach (17,2%) i należały one do gatunków: *L. seeligeri* (9 kiszonek z kukurydzy, 4 kiszonki z traw), *L. welshimeri* (4 kiszonki z kukurydzy, 3 kiszonki z traw) i *L. innocua* (2 kiszonki z kukurydzy, 2 kiszonki z traw). W badanych kiszonkach nie stwierdzono obecności bakterii z gatunków *C. botulinum*, *B. cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter* spp. czy *Salmonella*, co ma istotne znaczenie w aspekcie epizootycznym i epidemiologicznym. Wyniki badań jakości mikrobiologicznej kiszonek stosowanych w Polsce i w innych krajach przedstawiono w tabeli 2.

Odnosząc uzyskane przez autorów wyniki badań kiszonek do wymienionych powyżej jednostek chorobowych zwierząt, należy stwierdzić, że występowanie potencjalnych czynników patogennych w kiszonkach stosowanych w Polsce jest niskie (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*) lub bardzo niskie (*C. botulinum*), zwłaszcza gdy próbki kiszonek są pobierane z głębszych warstw prawidłowo przygotowanej kiszonki. Prewalencja tych patogenów w kiszonkach znacząco rośnie, gdy próbki kiszonek pobierane są z ognisk botulizmu czy listeriozy zwierząt i ludzi (niepublikowane dane autorów) lub z tych części kiszonek, gdzie ma dostęp tlen (*Listeria* spp.). Ponadto zachorowania zwierząt na tle niewłaściwej jakości mikrobiologicznej kiszonek mają miejsce zwykle, gdy zakiszanie roślin odbywa się niezgodnie z regułami sztuki (nawożenie pomiotem kurzym czy pozostałościami fermentacyjnymi z biogazowni, zakiszanie zielonek zebranych z terenów popowodziowych, niewłaściwa dojrzałość zakiszanych roślin, zbyt niskie koszenie roślin, niewystarczające rozdrobnienie/zgniecenie roślin, słabe ubicie kiszonki, nieszczelność opakowań, niewłaściwe wybieranie z silosu). Regułę tę potwierdzają także przypadki botulizmu zwierząt hodowlanych odnotowywane w ostatnich latach w Polsce. W większości z nich źródłem przetrwalników *C. botulinum* w kiszonce był pomiot kurzy, którym przez wiele lat nawożono pola przeznaczone do uprawy roślin kiszonkowych. W niektórych gospodarstwach botulizm bydła pojawiał się jeszcze przez wiele lat po zaprzestaniu tego rodzaju nawożenia, podobnie jak ma to miejsce na terenach endemicznie skażonych przez *C. botulinum*. Zapobieganie zachorowaniom zwierząt i ludzi na tle tych patogenów musi obejmować właściwe praktyki nawożenia terenów, z których pozyskuje się zakiszane zielonki, poprawnie prowadzony proces zakiszania

roślin, a także obróbkę termiczną żywności pochodzenia zwierzęcego (mleko, mięso), w której może występować *L. monocytogenes* (60, 61), *C. botulinum* czy toksyny botulinowe.

Piśmiennictwo

- Driehuis F.: Silage and the safety and quality of dairy foods: A review. *Agri & Food Sci* 2013, **22**, 16–34.
- Dvořáček J., Doležal P.: The effect of aerobically instable maize silage on the rumen fermentation in cows. *XIth International Scientific Symposium „Forage Conservation”*, Nitra 2003, Slovak Republic, 9th–11th September 2003, 160–161.
- Illek J.: Health Risks Posed by Feeding Low Quality Silage. *XII International Symposium „Forage Conservation”*, Brno, Czech Republic, April 3–5, 2006, 129–130.
- Driehuis F., Oude Elferink S.J.W.H.: The impact of the quality of silage on animal health and food safety: A review. *Vet Quart* 2000, **22**, 212–216.
- Visser M.M.M.: *Modeling to control spores in raw milk*. PhD thesis. Wageningen University, Wageningen, The Netherlands, 2007.
- Pahlow G., Muck R.E., Driehuis F., Oude Elferink S.J.W.H., Spoelstra S.F.: Microbiology of ensiling. W: Buxton D.R., Muck R.E., Harrison J.H. (edit): *Silage science and technology*. Madison: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, 2003, 31–93.
- Condon S.: Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEEMS Microbiol Rev* 1987, **46**, 267–280.
- Gollop N., Zakin V., Weinberg Z.G.: Antibacterial activity of lactic acid bacteria included in inoculants for silage and in silages treated with these inoculants. *J Appl Microbiol* 2005, **98**, 662–666.
- Marcinakova M., Simonova M., Stropfova V., Laukova A.: Occurrence of structural enterocin genes among silage enterococci. *Bull Vet Inst Pulawy* 2005, **49**, 387–392.
- Ratanapibulsawat C., Kroujkaew P., Sadahiro O., Nitisinprasert S., Chatinan R., Pumrussiri K., Sunee N.: Screening and characterization of lactic acid bacteria producing antimicrobial substance against *Staphylococcus aureus*. *J. Natural Sci* 2005, **39**, 284–293.
- Kapturowska A.U., Zielińska K.J., Stecka K.M.: Ocena jakości mleka surowego w powiązaniu z jakością kiszonek pasz objętościowych w wybranych gospodarstwach ekologicznych. *J Res Appl Agri Eng* 2012, **57**, 194–197.
- Podkówa Z., Podkówa W., Jermak B.: The effect of *Lactobacillus buchneri* on fermentation and aerobic stability of maize silage. *XIth International Scientific Symposium „Forage Conservation”*, Nitra 2003, Slovak Republic, 9th–11th September 2003, 124–125.
- Driehuis F., Te Giffel M.C., Van Egmont H.P., Frey J.M., Bluthgen A.: Feed-associated mycotoxins in the dairy chain: occurrence and control. *Bull Int Dairy Fed* 2010, **444**, 25.
- Dänicke S., Oldenburg E., Sator C., Ueberschär K.H., Valenta H.: Risikofaktoren für die Fusariumtoxinebildung in Futtermitteln und Vermeidungsstrategien bei der Futtermittelerzeugung und Fütterung. *Landbauforschung Volkenrode Sonderheft, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Braunschweig*, 2000, 216, 138.
- Cavallarini L., Borreani G., Tabacco E.: Mycotoxin occurrence in farm maize silages in northern Italy: Lüscher A., Jeangros B., Kessler W., Huguenin O., Lobsiger M., Müller N., Suter D.: Ed. *Land use systems in grassland dominated regions. Proceedings of the 20th General Meeting of the European Grassland Federation*, Luzern, Switzerland, 21–24 June 2004, 1023–1025.
- Muck R.E., Pitt R.E.: Aerobic deterioration in corn silage relative to the silo face. *Transactions of the ASABE* 1994, **37**, 735–743.
- Magnusson M., Christiansson A., Svensson B.: *Bacillus cereus* spores during housing of dairy cows: factors affecting contamination of raw milk. *J Dairy Sci* 2007, **90**, 2745–2754.
- Lindgren S., Pettersson K., Kaspersson A., Jonsson A., Lingvall P.: Microbial dynamics during aerobic deterioration of silages. *J Sci Food Agri* 1985, **36**, 765–774.
- Kleinschmit D.H., Kung Jr.L.: A meta-analysis of the effects of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation and aerobic stability of corn and grass and small-grain silages. *J Dairy Sci* 2006, **89**, 4005–4013.
- McDonald P., Henderson A.R., Heron S.J.E.: *The biochemistry of silage*. 2nd ed., Marlow: Chalcombe Publications, 1991, 340.

21. European Food Safety Authority: Microbiological risk assessment in feedingstuffs for food-producing animals. Scientific opinion of the panel on biological hazards. *The EFSA J* 2008, **7**, 20, 1–84.
22. Niederberger M., Oevermann A., Kirscher F., Meylan M.: Tremorgenic syndrome in a cattle herd after feeding silage contaminated with *Aspergillus clavatus*. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2011, **153**, 105–110.
23. Lindström M., Nevas M., Hielm S., Lähteenmäki L., Peck M.W., Korkeala H.: Thermal inactivation of nonproteolytic *Clostridium botulinum* type E spores in model fish media and in vacuum-packaged hot-smoked fish products. *Appl Environ Microbiol* 2003, **69**, 4029–4036.
24. Saeed E.M.A.: *Studies on isolation and identification of Clostridium botulinum investigating field samples specially from equine grass sickness cases*. PhD dissertation, Faculty of Agriculture, Goettingen University, 2004.
25. Spoelstra S.F.: Spores of lactate-fermenting clostridia in grass silage. W: Harkess R.D., Castle M.E.: *Sixth silage conference – silage production and utilization*. Queen Margaret College, Edinburgh, UK, 1981, 9–10.
26. Uriarte M.E., Bolsen K.K., Brent B.E.: Aerobic deterioration of silage: a review. *The Xth International Symposium "Forage Conservation"*, Brno, Czech Republic, April 3–5, 2006, 25–36.
27. Woolford M.K.: The detrimental effects of air of silage. *J Appl Bact* 1990, **68**, 101–116.
28. Böhnelt H., Gessler F.: Presence of *Clostridium botulinum* and botulinum toxin in milk and udder tissue of dairy cows with suspected botulism. *Vet Rec* 2013, **172**, 397–400.
29. Freeman P.: Botulism in cattle. *Primefacts* 2007, **596**, 1–3.
30. Braun U., Feige K., Schweizer G., Pospischil A.: Clinical findings and treatment of 30 cattle with botulism. *Vet Rec* 2005, **156**, 438–441.
31. Johnson A.L., McAdams S.C., Whitlock R.H.: Type A botulism in horses in the United States: a review of the past ten years (1998–2008). *J Vet Diagn Invest* 2010, **22**, 165–73.
32. Senturk S., Cihan H.: Outbreak of botulism in a dairy herd in Turkey. *Irish Vet J* 2007, **60**, 481–484.
33. Van Wuijckhuise L., Beekhuis A., Breukers W.A., Van Dijk P.: Botulism poisoning in cattle, a case report, diagnosis and prevention. *Tijdschr Diergeneeskd* 2002, **127**, 422–424.
34. Kruger M., Grosse-Herrenthey A., Schrod W., Gerlach A., Rodloff A.: Visceral botulism at dairy farms in Schleswig-Holstein, Germany – Prevalence of *Clostridium botulinum* in feces of cows, in animal feed, in feces of farmers, and in house dust. *Anaerob* 2012, **18**, 221–223.
35. Rodloff A.C., Krueger M.: Chronic *Clostridium botulinum* infection in farmers. *Anaerob* 2012, **18**, 226–228.
36. Guillet Ch., Join-Lambert O., Le Monnier A., Leclercq A., Mechaï F., Mamzer-Brunel M-F., Bielecka M.K., Scortti M., Disson O., Berche P., Vazquez-Boland J., Lortholary O., Lecuit M.: Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerg Infect Dis* 2010, **16**, 136–138.
37. Vázquez-Boland J.A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Domínguez-Bernal G., Goebel W., González-Zorn B., Wehland J., Krefl J.: *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev* 2001, **14**, 584–640.
38. European Food Safety Authority: Scientific report of EFSA and ECDC. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *EFSA J* 2012, **10**, 2597.
39. Salwa A., Kopczewski A., Borkowska-Opacka B., Przewoski W., Strzałkowski L., Sroka A., Arent Z., Malinowski E., Lachowski A.: Enzootia listeriozy u bydła na Kaszubach. *Med. Weter.* 2007, **63**, 1579–1582.
40. Goulet V., Leclercq A., Vaillant V., Le Monnier A., Laurent E., Thierry-Bled F., Pihier N., De Valk H.: Recrudescence récente des cas de listériose en France. *BEH* 2008, **30–31**, 268–272.
41. Quinn P.J., Carter M.E., Markey B., Carter G.R.: *Veterinary microbiology microbial diseases-bacterial causes of bovine mastitis*. 8th ed., Mosby International Limited, London 2002, 170.
42. Ryser E.T., Marth E.H.: *Listeria, listeriosis and food safety*. 2nd ed., Marcel Dekker, NY 1999.
43. Vilar M.J., Yus E., Sanjuán M.L., Diéguez F.J., Rodríguez-Otero J.L.: Prevalence of and risk factors for *Listeria* species on dairy farms. *J Dairy Sci* 2007, **90**, 5083–5088.
44. Dennis S.M.: Listeriosis (circling disease, silage sickness). W: *Current Veterinary Therapy. Food Animal Practice*. Philadelphia, Saunders W. B., 1993, 580–583.
45. Fenlon D.R.: Wild birds and silage as reservoir of *Listeria monocytogenes* in the agricultural environment. *J Appl Bacteriol* 1985, **59**, 537–543.
46. Schweizer G., Ehrensperger F., Torgerson P. R., Braun U.: Clinical findings and treatment of 94 cattle presumptively diagnosed with listeriosis. *Vet Rec* 2005, **29**, 588–592.
47. Weiss J., Seeliger H.P.R.: Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. *Appl Microbiol* 1975, **29**, 29–32.
48. Shetty A., McLauchlin J., Grant K., O'Brien D., Howard T., Davies E.M.: Outbreak of *Listeria monocytogenes* in an oncology unit associated with sandwiches consumed in hospital. *J Hosp Infect* 2009, **72**, 332–336.
49. Hussein H.S., Sakuma T.: Prevalence of shigatoxin-producing *Escherichia coli* in dairy cattle and their products. *J Dairy Sci* 2005, **88**, 450–65.
50. Fenlon D.R., Wilson J.: Growth of *Escherichia coli* O157 in poorly fermented laboratory silage: a possible environmental dimension in the epidemiology of *E. coli* O157. *Lett Appl Microbiol* 2000, **30**, 118–121.
51. Pedrosa A.F., Adesogan A.T., Queiroz O.C., Williams S.K.: Control of *Escherichia coli* O157:H7 in corn silage with or without various inoculants: efficacy and mode of action. *J Dairy Sci* 2010, **93**, 1098–1104.
52. Borreani G., Dolci P., Tabacco E., Cocolin L.: Aerobic deterioration stimulates outgrowth of spore-forming *Paenibacillus* in corn silage stored under oxygen-barrier or polyethylene films. *J Dairy Sci* 2013, **96**, 5206–5216.
53. Cai Y., Benno Y., Ogawa M., Ohmomo S., Kumai S., Nakase T.: Influence of *Lactobacillus* spp. from an inoculant and of *Weissella* and *Leuconostoc* spp. from forage crops on silage fermentation. *Appl Environ Microbiol* 1998, **64**, 2982–2987.
54. Dorszewski P., Grabowicz M., Szterk P., Grajewski J., Twarużek M.: Wpływ fermentacji na status mikrobiologiczny i mikotoksykologiczny kisonki z lucerny. *Med Weter.* 2013, **69**, 622–625.
55. Driehuis F., Rademaker J.L.W., Wells-Benik M.H.J.: The occurrence of spores of *Bacillus* and *Paenibacillus* in silage. *Proceedings of the 15th International Silage Conference*, 27–29 July 2009, Madison, WI, US Dairy Forage Research Center, USDA-Agricultural Research Service, 377–378.
56. Slaghuys B.A., Te Giffel M.C., Beumer R.R., André G.: Effect of pasturing on the incidence of *Bacillus cereus* spores in raw milk. *Int Dairy J* 1997, **7**, 201–205.
57. Szymańska G., Sulewska H., Selwet M.: Hygienic condition of maize silage (*Zea mays* L.) depending on cutting height and ensiling additive. *Turk J Agri For* 2014, **38**, 354–361.
58. Vissers M.M.M., Driehuis F., Te Giffel M.C., De Jong P., Langveld J.M.G.: Concentration of butyric acid bacteria spores in silage and relationship with aerobic deterioration. *J Dairy Sci* 2007, **90**, 928–936.
59. Vlková E., Rada V., Bunešová V., Ročková Š.: Growth and survival of lactic acid bacteria in lucerne silage. *Fol Microbiol* 2012, **57**, 359–362.
60. Kwiatek K.: Occurrence of *Listeria monocytogenes* in selected food of animal origin. *Bull Vet Inst Pulawy* 2004, **48**, 269–272.
61. Kwiatek K., Wojtoń B., Rola J., Różańska H.: The incidence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in meat, poultry and raw milk. *Bull Vet Inst Pulawy* 1992, **35**, 7–11.

Dr n. wet. Elżbieta Kukier, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy, Al. Partyzantów 57, 24–100 Puławy, tel. 81 889 31 93, e-mail: elawoj@piwet.pulawy.pl